



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 345 720**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05737453 .0**

96 Fecha de presentación : **04.05.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1761640**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.03.2007**

54 Título: **SENP1 como marcador de cáncer.**

30 Prioridad: **06.05.2004 US 569220 P**
05.08.2004 US 599318 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.09.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.09.2010

73 Titular/es: **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.**
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es: **Holcomb, Cherie;**
Higuchi, Russell y
Schoenbrunner, Nancy

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

SENP1 como marcador de cáncer.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para detectar células de cáncer mediante la detección de la cantidad de SENP1 y/o telomerasa en una muestra.

10 Antecedentes de la invención

La mayoría de células en el cuerpo humano adulto normal no se divide. Sin embargo, las células de cáncer escapan a la regulación del crecimiento y se dividen sin restricciones. Para ello, deben replicar sus cromosomas, incluyendo los extremos de estos cromosomas, denominados télómeros. La activación del enzima, la telomerasa, que añade secuencia telomérica a los extremos cromosómicos (revisado en Collins K., Curr. Opin. Cell Biol. 12:378-382, 2000) puede superar esta senescencia (ver BoADNr A.G. *et al.*, Science 279:349-352, 1998; revisado en De Lange T., Science 279:334-335, 1998). Las líneas celulares con telomerasa activa se immortalizan. *In vivo*, las células anteriormente senescentes con telomerasa activa crecen para convertirse en tumores. La actividad de telomerasa se ha detectado en esencialmente la totalidad de los tipos principales de cáncer (Shay J.W. y Bacchetti S., Eur. J. Cancer 33:787-791, 1997; Cong Y.S. *et al.*, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66:407-425, 2002). Hanahan y Weinberg consideran la expresión de la subunidad catalítica de la telomerasa como uno de los seis sucesos clave comunes al cáncer (Cell 100:57-70, 2000). La expresión de los genes codificantes de la telomerasa (TERT y TERC) se ha propuesto como marcador molecular para el diagnóstico, seguimiento y pronóstico del cáncer.

La patente WO nº 2004/031412 da a conocer SENP-1 como uno de entre 605 genes regulados en el cáncer pancreático.

La patente EP nº 1 108 789 da a conocer métodos para cuantificar la expresión de ARN de hTERT que resultan útiles para el diagnóstico y el pronóstico de cáncer.

Sin embargo, no todos los tumores de un tipo dado de cáncer contienen niveles detectables de actividad de telomerasa (ver, por ejemplo, Shay J.W. y Bacchetti S., Eur. J. Cancer 33:787-791, 1997; Yan P. *et al.*, Cancer Res. 59:3166-3170, 1999). Por lo tanto, resulta importante identificar los marcadores moleculares que identifican los tumores inmortalizados por un mecanismo independiente de telomerasa.

Breve descripción resumida de la invención

La presente invención proporciona datos que demuestran que existe una asociación entre el cáncer de vejiga y la cantidad de expresión de SENP1. De esta manera, SENP1 proporciona un marcador útil para la detección del cáncer de vejiga.

En algunas realizaciones, el método comprende además la obtención de la muestra biológica a partir del individuo.

En algunas realizaciones se determina la secuencia del polinucleótido. En algunas realizaciones, la etapa de detección comprende amplificar el polinucleótido en una reacción de amplificación. En algunas realizaciones, la reacción de amplificación comprende por lo menos dos oligonucleótidos diferentes que comprenden una secuencia por lo menos 90% idéntica a por lo menos 10 nucleótidos contiguos de la secuencia SEC ID nº 1, o un complemento de la misma, de manera que, durante la reacción de amplificación, los oligonucleótidos ceban la amplificación de por lo menos un fragmento de la secuencia SEC ID nº 1. En algunas realizaciones, la reacción de amplificación es una reacción de amplificación cuantitativa. En algunas realizaciones, el producto de amplificación de la reacción de amplificación se detecta en una etapa que comprende hibridar con el producto un oligonucleótido detectablemente marcado. En algunas realizaciones, el oligonucleótido detectablemente marcado comprende un grupo fluorescente. En algunas realizaciones, el oligonucleótido detectablemente marcado comprende un grupo desactivador. En algunas realizaciones, la reacción de amplificación comprende una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que presenta actividad 5' a 3' exonucleasa bajo condiciones que permiten que la polimerasa fragmente el oligonucleótido detectablemente marcado. En algunas realizaciones, la reacción de amplificación es una reacción en cadena de polimerasa-transcriptasa inversa (RT-PCR). En algunas realizaciones, la reacción de RT-PCR es una reacción de RT-PCR cuantitativa. En algunas realizaciones, se normaliza la cantidad del polinucleótido.

En algunas realizaciones, se determina la cantidad de SENP1 mediante la detección de un polipéptido SENP1 en la muestra. En algunas realizaciones, el polipéptido se detecta mediante la puesta en contacto del polipéptido con un anticuerpo.

En algunas realizaciones, se detecta SENP1 mediante la detección de la actividad de SENP1.

En algunas realizaciones, el método comprende además determinar la cantidad de telomerasa en la muestra biológica. En algunas realizaciones, se detecta la telomerasa mediante la detección de la actividad de telomerasa. En algunas realizaciones, se detecta la actividad de telomerasa mediante la detección de alargamiento de un oligonucleótido que comprende dos o más repeticiones de TTAGG.

5

En algunas realizaciones, se detecta la telomerasa mediante la detección de un componente de la telomerasa en la muestra. En algunas realizaciones, el componente es ARN de telomerasa humana (TERC). En algunas realizaciones, el componente es proteína transcriptasa inversa de telomerasa humana (TERT). En algunas realizaciones, se detecta telomerasa mediante la detección de ARNm de proteína transcriptasa inversa de telomerasa humana (TERT). En algunas realizaciones, el método comprende amplificar un polinucleótido SENP1 y un polinucleótido telomerasa en una reacción de amplificación multiplex. En algunas realizaciones, el polinucleótido de telomerasa es ARN de telomerasa humana (TERC). En algunas realizaciones, el polinucleótido de telomerasa es ARNm de proteína transcriptasa inversa de telomerasa humana (TERT). En algunas realizaciones, el método comprende además comparar la cantidad de SENP1 y telomerasa en la muestra con un estándar de SENP1 y una estándar de telomerasa, respectivamente, en la que el estándar de SENP1 representa SENP1 en células no de cáncer y el estándar de telomerasa representa cantidades de telomerasa en células no de cáncer. En algunas realizaciones, los estándares son valores predeterminados.

10

15

En algunas realizaciones, el individuo es un ser humano. En algunas realizaciones, el método comprende además registrar un pronóstico para el tratamiento del cáncer y/o la supervivencia del individuo. En algunas realizaciones, el método comprende además registrar la progresión del cáncer en el individuo.

20

La presente exposición también proporciona métodos para identificar un antagonista de SENP1. En algunas realizaciones, los métodos comprenden poner en contacto una pluralidad de agentes con una célula que expresa SENP1, en donde la célula no expresa telomerasa y la célula expresa un fenotipo neoplásico, y seleccionar un agente que inhibe un fenotipo neoplásico, identificando de esta manera un antagonista de SENP1. En algunas realizaciones, la célula no expresa TERT. En algunas realizaciones, los métodos comprenden además someter a ensayo el efecto del agente seleccionado sobre células de cáncer seleccionadas de entre el grupo que consiste de cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer pancreático y cáncer de intestino delgado. En algunas realizaciones, el fenotipo neoplásico es crecimiento celular neoplásico. En algunas realizaciones, el fenotipo neoplásico es la expresión de un polipéptido o ARN asociado al crecimiento neoplásico. En algunas realizaciones, la célula expresa endógenamente SENP1. En algunas realizaciones, la célula comprende un casete de expresión exógena codificante de SENP1.

25

30

La presente exposición también proporciona métodos de tratar un individuo que presenta un cáncer. En algunas realizaciones, los métodos comprenden administrar en un ser humano una cantidad terapéutica de un antagonista de SENP1, en donde el individuo presenta un cáncer caracterizado por la expresión incrementada de SENP1 en comparación con las células no de cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste de cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de páncreas y cáncer de intestino delgado. En algunas realizaciones, el antagonista se identifica mediante las etapas de: poner en contacto una pluralidad de agentes con una célula que expresa SENP1, en donde la célula no expresa telomerasa y la célula expresa un fenotipo neoplásico, y seleccionar un agente que inhibe un fenotipo neoplásico, identificando de esta manera un antagonista de SENP1. En algunas realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un antagonista de SENP1 y un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones se proporciona un antagonista de SENP1 para la utilización en medicina. En algunas realizaciones se utiliza un antagonista de SENP1 en la preparación de un medicamento o para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de cáncer, en particular de cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, y cáncer de intestino delgado. Resulta particularmente preferente el cáncer de vejiga.

35

40

45

La presente exposición también proporciona inhibidores de la actividad de proteasa de SENP1. En algunas realizaciones, los inhibidores comprenden una secuencia de aminoácido que comprende Glu-Gln-Thr-Gly-Gly, o un mimético de la misma, en donde la Gly final termina en un aldehído. En algunas realizaciones el inhibidor comprende una secuencia de señal de localización nuclear. En algunas realizaciones la secuencia de señal de localización nuclear comprende Pro-Lys-Lys-Thr-Gln-Arg-Arg.

50

La presente invención también proporciona la determinación de la cantidad de SENP1 y telomerasa en una muestra biológica procedente de un individuo. En algunas realizaciones se detecta la cantidad de SENP1 mediante la detección de un polinucleótido codificante de SENP1 en la muestra. En algunas realizaciones el polinucleótido es ARN.

55

En algunas realizaciones se determina la secuencia del polinucleótido. En algunas realizaciones, la etapa de detección comprende amplificar el polinucleótido en una reacción de amplificación. En algunas realizaciones, la reacción de amplificación comprende por lo menos dos oligonucleótidos diferentes que comprenden una secuencia por lo menos 90% idéntica a por lo menos 10 nucleótidos contiguos de la secuencia SEC ID n° 1, o un complemento de la misma, de manera que, durante la reacción de amplificación, los oligonucleótidos ceban la amplificación de por lo menos un fragmento de secuencia SEC ID n° 1. En algunas realizaciones, la reacción de amplificación es una reacción de amplificación cuantitativa. En algunas realizaciones, el producto de amplificación de la reacción de amplificación se detecta en una etapa que comprende hibridar un oligonucleótido detectablemente marcado con el producto. En algunas realizaciones, el oligonucleótido detectablemente marcado comprende un grupo fluorescente. En algunas realizaciones, el oligonucleótido detectablemente marcado comprende un grupo desactivador. En algunas realizaciones,

60

65

ES 2 345 720 T3

la reacción de amplificación comprende una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que presenta actividad 5' a 3' exonucleasa bajo condiciones que permiten que la polimerasa fragmente el oligonucleótido detectablemente marcado.

5 En algunas realizaciones, la reacción de amplificación es una reacción en cadena de polimerasa-transcriptasa inversa (RT-PCR). En algunas realizaciones, la reacción de RT-PCR es una reacción de RT-PCR cuantitativa.

En algunas realizaciones se normaliza la cantidad del polinucleótido.

10 En algunas realizaciones se determina la cantidad de SENP1 mediante la detección de un polipéptido SENP1 en la muestra. En algunas realizaciones se detecta el polipéptido mediante la puesta en contacto del polipéptido con un anticuerpo.

En algunas realizaciones, se detecta SENP1 mediante la detección de la actividad de SENP1.

15 En algunas realizaciones, se detecta la telomerasa mediante la detección de la actividad de telomerasa. En algunas realizaciones, se detecta la actividad de telomerasa mediante la detección del alargamiento de un oligonucleótido que comprende dos o más repeticiones de TTAGG.

20 En algunas realizaciones, se detecta la telomerasa mediante la detección de un componente de la telomerasa en la muestra. En algunas realizaciones, el componente es ARN de telomerasa humana (TERC). En algunas realizaciones, el componente es proteína transcriptasa inversa de telomerasa humana (TERT).

25 En algunas realizaciones, se detecta la telomerasa mediante la detección de ARNm de proteína transcriptasa inversa de telomerasa humana (TERT).

30 En algunas realizaciones, el método comprende amplificar un polinucleótido SENP1 y un polinucleótido de telomerasa en una reacción de amplificación multiplex. En algunas realizaciones, el polinucleótido de telomerasa es ARN de telomerasa humana (TERC). En algunas realizaciones, el polinucleótido de telomerasa es el ARNm de la proteína transcriptasa inversa de telomerasa humana (TERT).

35 En algunas realizaciones, los métodos comprenden además comparar la cantidad de SENP1 y de telomerasa en la muestra con un estándar de SENP1 y un estándar de telomerasa que representan las cantidades de SENP1 y de telomerasa en las células no de cáncer. En algunas realizaciones, los estándares son valores predeterminados.

En algunas realizaciones el individuo es un ser humano.

40 En algunas realizaciones, la muestra biológica comprende un líquido corporal. En algunas realizaciones, el líquido corporal es sangre. En algunas realizaciones, el líquido corporal es orina. En algunas realizaciones, la muestra es de una biopsia de tejido. En algunas realizaciones, el método comprende además obtener una muestra biológica del individuo.

45 En algunas realizaciones, el individuo presenta, o se sospecha que presenta cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de vejiga.

50 En algunas realizaciones, el método comprende además registrar un diagnóstico de la presencia o ausencia de cáncer en el individuo. En algunas realizaciones, el método comprende además registrar un pronóstico para el tratamiento del cáncer y/o la supervivencia del individuo. En algunas realizaciones, el método comprende además registrar la progresión del cáncer en el individuo. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de vejiga.

La presente invención también proporciona kits para detectar una célula de cáncer en una muestra biológica de un individuo. En algunas realizaciones, el kit comprende:

55 a) por lo menos un oligonucleótido que comprende una secuencia por lo menos 90% idéntica a por lo menos 10 nucleótidos contiguos de la secuencia SEC ID n° 1, o un complemento de la misma, de manera que, al someter el oligonucleótido y un polinucleótido que comprende la secuencia SEC ID n° 1 a una reacción de amplificación, el oligonucleótido ceba la amplificación de por lo menos un fragmento de secuencia SEC ID n° 1,

60 b) un oligonucleótido detectablemente marcado que comprende una secuencia por lo menos 90% idéntica a por lo menos 10 nucleótidos contiguos de la secuencia SEC ID n° 1, o un complemento de la misma,

c) por lo menos un oligonucleótido que comprende una secuencia por lo menos 90% idéntica a por lo menos 10 nucleótidos contiguos de:

65 i) ARN de telomerasa humana (TERC),

ii) ARNm de proteína transcriptasa inversa de telomerasa humana (TERT),

ES 2 345 720 T3

iii) un complemento de TERC, o

iv) un complemento de TERT,

5 de manera que, al someter TERC o ARNm de TERT a una reacción de amplificación, el oligonucleótido ceba la amplificación de por lo menos un fragmento de TERC o de ARNm de TERT, y

d) un oligonucleótido detectablemente marcado que comprende una secuencia por lo menos 90% idéntica a por lo menos 10 nucleótidos contiguos de:

10

i) ARN de telomerasa humana (TERC),

ii) ARNm de proteína transcriptasa inversa de telomerasa humana (TERT),

15

iii) un complemento de TERC, o

iv) un complemento de TERT,

20 de manera que, al someter los oligonucleótidos y TERC o ARNm de TERT a una reacción de amplificación, los oligonucleótidos ceban la amplificación de por lo menos un fragmento de TERC o de ARNm de TERT.

En algunas realizaciones, el kit comprende además transcriptasa inversa. En algunas realizaciones, el kit comprende además una ADN polimerasa termoestable.

25

En algunas realizaciones, los oligonucleótidos detectablemente marcados comprenden un grupo fluorescente. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos detectablemente marcados comprenden un grupo desactivador.

La presente invención también proporciona una mezcla de reacción. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción comprende:

30

a) por lo menos un oligonucleótido que comprende una secuencia por lo menos 90% idéntica a por lo menos 10 nucleótidos contiguos de secuencia SEC ID nº 1, o un complemento de la misma, de manera que, al someter el oligonucleótido y un polinucleótido que comprende la secuencia SEC ID nº 1 a una reacción de amplificación, el oligonucleótido ceba la amplificación de por lo menos un fragmento de secuencia SEC ID nº 1,

35

b) un oligonucleótido detectablemente marcado que comprende una secuencia por lo menos 90% idéntica a por lo menos 10 nucleótidos contiguos de secuencia SEC ID nº 1, o un complemento de la misma,

40

c) por lo menos un oligonucleótido que comprende una secuencia por lo menos 90% idéntica a por lo menos 10 nucleótidos contiguos de:

i) ARN de telomerasa humana (TERC),

45

ii) ARNm de proteína transcriptasa inversa de telomerasa humana (TERT),

iii) un complemento de TERC, o

iv) un complemento de TERT,

50

de manera que, al someter el oligonucleótido y TERC o ARNm de TERT a una reacción de amplificación, el oligonucleótido ceba la amplificación de por lo menos un fragmento de TERC o de ARNm de TERT, y

d) un oligonucleótido detectablemente marcado que comprende una secuencia por lo menos 90% idéntica a por lo menos 10 nucleótidos contiguos de:

55

i) ARN de telomerasa humana (TERC),

ii) ARNm de proteína transcriptasa inversa de telomerasa humana (TERT),

60

iii) un complemento de TERC, o

iv) un complemento de TERT.

65

En algunas realizaciones, la mezcla de reacción comprende por lo menos dos oligonucleótidos diferentes que comprenden una secuencia por lo menos 90% idéntica a por lo menos 10 nucleótidos contiguos de secuencia SEC

ES 2 345 720 T3

ID n° 1, o un complemento de la misma, de manera que, al someter los oligonucleótidos y un polinucleótido que comprende la secuencia SEC ID n° 1 a una reacción de amplificación, los oligonucleótidos ceban la amplificación de por lo menos un fragmento de secuencia SEC ID n° 1, y por lo menos dos oligonucleótidos diferentes que comprenden una secuencia por lo menos 90% idéntica a por lo menos 10 nucleótidos contiguos de:

- i) ARN de telomerasa humana (TERC),
- ii) ARNm de proteína transcriptasa inversa de telomerasa humana (TERT),
- iii) un complemento de TERC, o
- iv) un complemento de TERT,

de manera que, al someter los oligonucleótidos y TERC o ARNm de TERT a una reacción de amplificación, los oligonucleótidos ceban la amplificación de por lo menos un fragmento de TERC o de ARNm de TERT.

En algunas realizaciones, la mezcla de reacción comprende además una transcriptasa inversa. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción comprende además una ADN polimerasa termoestable. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción comprende además los oligonucleótidos detectablemente marcados que comprenden un grupo fluorescente. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción comprende además los oligonucleótidos detectablemente marcados que comprenden un grupo desactivador.

La presente invención también proporciona la determinación de la cantidad de SENP1 y de telomerasa en una muestra biológica procedente de un individuo. En algunas realizaciones, la cantidad de SENP1 se detecta mediante la detección de un polinucleótido codificante de SENP1 en la muestra. En algunas realizaciones el polinucleótido es ARN.

En algunas realizaciones se determina la secuencia del polinucleótido. En algunas realizaciones, la etapa de detección comprende amplificar el polinucleótido en una reacción de amplificación. En algunas realizaciones, la reacción de amplificación comprende por lo menos dos oligonucleótidos diferentes que comprenden una secuencia por lo menos 90% idéntica a por lo menos 10 nucleótidos contiguos de secuencia SEC ID n° 1, o un complemento de la misma, de manera que, durante la reacción de amplificación, los oligonucleótidos ceban la amplificación de por lo menos un fragmento de secuencia SEC ID n° 1. En algunas realizaciones, la reacción de amplificación es una reacción de amplificación cuantitativa. En algunas realizaciones se detecta el producto de amplificación de la reacción de amplificación en una etapa que comprende hibridar un oligonucleótido detectablemente marcado con el producto. En algunas realizaciones, el oligonucleótido detectablemente marcado comprende un grupo fluorescente. En algunas realizaciones, el oligonucleótido detectablemente marcado comprende un grupo desactivador. En algunas realizaciones, la reacción de amplificación comprende una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que presenta actividad 5' a 3' exonucleasa bajo condiciones que permiten que la polimerasa fragmente el oligonucleótido detectablemente marcado.

En algunas realizaciones, la reacción de amplificación es una reacción en cadena de polimerasa-transcriptasa inversa (RT-PCR). En algunas realizaciones, la reacción de RT-PCR es una reacción de RT-PCR cuantitativa.

En algunas realizaciones, se normaliza la cantidad del polinucleótido.

En algunas realizaciones, se determina la cantidad de SENP1 mediante la detección de un polipéptido SENP1 en la muestra. En algunas realizaciones, el polipéptido se detecta poniendo en contacto el polipéptido con un anticuerpo.

En algunas realizaciones, SENP1 se detecta mediante la detección de actividad de SENP1.

En algunas realizaciones, se detecta telomerasa mediante la detección de actividad de telomerasa. En algunas realizaciones se detecta la actividad de telomerasa mediante la detección del alargamiento de un oligonucleótido que comprende dos o más repeticiones de TTAGG.

En algunas realizaciones, la telomerasa se detecta mediante la detección de un componente de telomerasa en la muestra. En algunas realizaciones, el componente es ARN de telomerasa humana (TERC). En algunas realizaciones, el componente es proteína transcriptasa inversa de telomerasa humana (TERT).

En algunas realizaciones, la telomerasa se detecta mediante la detección de ARNm de proteína transcriptasa inversa de telomerasa humana (TERT).

En algunas realizaciones, el método comprende amplificar un polinucleótido SENP1 y un polinucleótido de telomerasa en una reacción de amplificación multiplex. En algunas realizaciones, el polinucleótido de telomerasa es ARN de telomerasa humana (TERC). En algunas realizaciones, el polinucleótido de telomerasa es ARNm de proteína transcriptasa inversa de telomerasa humana (TERT).

ES 2 345 720 T3

En algunas realizaciones, los métodos comprenden además comparar la cantidad de SENP1 y telomerasa en la muestra a un estándar de SENP1 y un estándar de telomerasa que representan las cantidades SENP1 y de telomerasa en células no de cáncer. En algunas realizaciones, los estándares son valores predeterminados.

5 En algunas realizaciones, el individuo es un ser humano.

En algunas realizaciones, la muestra biológica comprende un líquido corporal. En algunas realizaciones, el líquido corporal es sangre. En algunas realizaciones, el líquido corporal es orina. En algunas realizaciones, la muestra procede de una biopsia de tejido. En algunas realizaciones, el método comprende además obtener una muestra biológica de un individuo.

En algunas realizaciones, el individuo presenta, o se sospecha que presenta cáncer.

15 En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de vejiga.

En algunas realizaciones, el método comprende además registrar un diagnóstico de la presencia o ausencia de cáncer en el individuo. En algunas realizaciones, el método

Breve descripción de los dibujos

20 La figura 1 ilustra una curva típica de receptor-operador del ARNm de SENP1 de sedimento urinario de un paciente de cáncer de vejiga negativo para telomerasa y de un sujeto sano.

25 La figura 2 ilustra una curva de receptor-operador de SENP1 normalizado a la proteína fosfatasa 1 de gen de mantenimiento, subunidad catalítica, isoforma alfa (PPP1CA).

Las figuras 3A y 3B ilustran el nivel de expresión de SENP1 y de TERT respecto a la expresión ajustada de GAPDH en tejido de vejiga normal y tejido de vejiga tumoral.

30 Por conveniencia proporcionar los datos en el gráfico a la misma escala, la expresión de TERT se ha multiplicado por un factor de 1×10^5 .

Definiciones

35 “SENP1” se refiere al polipéptido proteasa específico de sentrina/SUMO o a un polinucleótido codificante del polipéptido. Entre los polinucleótidos de SENP1 ejemplares se incluyen, por ejemplo, el número de acceso de Genbank NM_014354 (SEC ID n° 1). Entre los polipéptidos SENP1 ejemplares se incluyen, por ejemplo, el polipéptido ilustrado en el número de acceso Genbank NP_055369 (SEC ID n° 2). El término “SENP1” pretende incluir las variantes alélicas de aquellas secuencias específicamente proporcionadas en la presente memoria, así como los fragmentos y mutaciones de las mismas. Los polinucleótidos SENP generalmente son por lo menos 90%, 95% o 99% idénticas a la secuencia SEC ID n° 1, o 90%, 95% o 99% idénticas a las secuencias d ADN codificantes de la secuencia SEC ID n° 2. Entre los polinucleótidos de SENP1 se incluyen, por ejemplo, ARNm codificante de polipéptidos SENP1, así como secuencias de ADN (por ejemplo ADNc o ARN genómico) codificante de polipéptidos SENP1. Los polipéptidos SENP1 generalmente son por lo menos 90%, 95% o 99% idénticos a la secuencia SEC ID n° 2.

45 El término “telomerasa” se refiere a un complejo riboproteico que mantiene los extremos de los cromosomas (telómeros), o a polinucleótidos codificantes de componentes de la riboproteína (ver, por ejemplo, Shippen-Lentz *et al.*, Science 247:546, 1990; Greiden *et al.*, Nature 337:331, 1989). La telomerasa incluye dos componentes principales: la proteína transcriptasa inversa de la telomerasa (codificada por el gen *TERT*) y el componente ARN de la telomerasa (codificado por el gen *TERC*). Los componentes humanos equivalentes se conocen como TERT (por ejemplo secuencia de proteína NP_003210 (SEC ID n° 3), codificada, por ejemplo, por la secuencia de nucleótidos NM_003219 (SEC ID n° 4) y TERC (NR_001566, SEC ID n° 5). Las variantes de procesamiento del ARN codificante de TERT pretenden encontrarse comprendidas dentro de esta definición.

55 La expresión “poner en contacto una pluralidad de agentes con una célula” se refiere a poner en contacto por lo menos dos agentes con una célula o células. Aunque pueden ponerse en contacto múltiples agentes con una célula o grupo de células, la expresión también comprende poner en contacto un primer agente con una primera célula o grupo de células, y un segundo agente con una segunda célula o grupo de células, por ejemplo de manera que cada célula o grupo de células se ponga en contacto con un único agente.

60 La expresión “determinar la cantidad de SENP1 o de telomerasa” se refiere a utilizar cualquier técnica conocida por el experto en la materia para cuantificar la cantidad de SENP1 o polipéptido o polinucleótido de telomerasa (por ejemplo ARN estructural, ARNm o ADNc), o SENP1 o actividad de telomerasa en una muestra.

65 Un “fenotipo neoplásico” se refiere al fenotipo de una célula neoplásica. Entre los fenotipos ejemplares se incluyen, por ejemplo, el crecimiento celular en agar blando; la independencia de anclaje; la inhibición por contacto reducido y/o la limitación por densidad del crecimiento; la proliferación celular; la transformación celular; la independencia de factor de crecimiento o de suero; la acumulación de niveles de marcador específico de tumor; la invasividad en

Matrigel; el crecimiento tumoral y la metástasis *in vivo*; los patrones de ARNm y de expresión de proteínas de células que experimentan metástasis, y otras características de las células de cáncer.

Una “reacción de amplificación” se refiere a cualquier reacción (por ejemplo química o enzimática) que resulta en un número incrementado de copias de una secuencia molde de ácidos nucleicos o un nivel incrementado de señal que indica la presencia del ácido nucleico molde. Las expresiones “amplificación selectiva” o “amplificar selectivamente” se refieren a la amplificación de secuencias particulares en una población de secuencias.

La expresión “muestra biológica” comprende una diversidad de tipos de muestra obtenidos de un organismo, y puede utilizarse en un ensayo diagnóstico o de seguimiento. La expresión comprende orina, sedimento urinario, sangre, saliva y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras de tejido sólido, tales como un espécimen de biopsia o cultivos de tejidos o células derivadas de los mismos y la progenie de las mismas. La expresión comprende muestras que han sido manipuladas de cualquier manera tras su recolección, tal como mediante tratamiento con reactivos, solubilización, sedimentación o enriquecimiento para determinados componentes. La expresión comprende una muestra clínica, y también incluye células en cultivo celular, sobrenadantes celulares, lisados celulares, suero, plasma, líquidos corporales y muestras de tejido.

Un “antagonista” se refiere a una molécula que, al ponerse en contacto con una célula que expresa SENP1, inhibe la actividad o expresión de SENP1. Los antagonistas son compuestos que, por ejemplo, se unen, bloquean parcial o totalmente una actividad, reducen, impiden, retrasan la activación, inactivan, desensibilizan o regulan negativamente la actividad o expresión de SENP1.

Tal como se utilizan en la presente memoria, las expresiones “ácido nucleico”, “nucleótido”, “polinucleótido” y “oligonucleótido” se refieren a cebadores, sondas, fragmentos oligómeros que deben detectarse, controles oligómeros y oligómeros de bloqueo no marcados y es genérico para polidesoxirribonucleótidos (que contienen 2-desoxi-D-ribosa), de polirribonucleótidos (que contienen D-ribosa) y de cualquier otro N-glucósido de una purina o base pirimidina, o bases purina o pirimidina modificadas.

Un ácido nucleico, nucleótido, polinucleótido u oligonucleótido puede comprender enlaces fosfodiéster o enlaces modificados, incluyendo, aunque sin limitación, fosfotriéster, fosforamido, siloxano, carbonato, carboximetiléster, acetamido, carbamato, tioéter, fosforamido puente, fosfonato de metileno puente, fosforotioato, metilfosfonato, fosforoditioato, fosforotioato puente o enlaces sulfona, y combinaciones de dichos enlaces. Las expresiones comprenden ácidos nucleicos de péptidos (APNs) y ácidos nucleicos intercalados (INAs).

Un ácido nucleico, nucleótido, polinucleótido u oligonucleótido puede comprender las cinco bases biológicamente naturales (adenina, guanina, timina, citosina y uracilo) y/o otras bases aparte de las cinco bases biológicamente naturales. Estas bases pueden presentar varios propósitos, por ejemplo estabilizar o desestabilizar la hibridación; estimular o inhibir la degradación de una sonda; o como puntos de unión para grupos detectables o grupos desactivadores. Por ejemplo, un polinucleótido de la invención puede contener uno o más grupos de bases modificadas, no estándares o derivatizadas, incluyendo, aunque sin limitación, N⁶-metil-adenina, N⁶-terc-butil-benciladenina, imidazol, imidazolas sustituidas, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N⁶-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N⁶-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N⁶-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metiléster de ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3N-2-carboxipropil)uracilo, (acp3)w, 2,6-diaminopurina y 5-propinilpirimidina. Otros ejemplos de grupos de bases modificadas, no estándares o derivatizadas pueden encontrarse en las patentes US n° 6.011.611, n° 5.955.589, n° 5.844.106, n° 5.789.562, n° 5.750.343, n° 5.728.525 y n° 5.679.785, cada una de las cuales se incorpora como referencia en su totalidad.

Además, un ácido nucleico, nucleótido, polinucleótido u oligonucleótido puede comprender uno o más grupos sacáridos modificados, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa y hexosa.

No se pretende que la presente invención se encuentra limitada por la fuente de un ácido nucleico, nucleótido, polinucleótido u oligonucleótido. Un ácido nucleico, nucleótido, polinucleótido u oligonucleótido puede proceder de un mamífero humano o no humano, o de cualquier otro organismo, o derivarse a partir de cualquier fuente recombinante, sintetizarse *in vitro* u obtenerse mediante síntesis química. Un ácido nucleico, nucleótido, polinucleótido u oligonucleótido puede ser ADN, ARN, ADNc, ADN-ARN, ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido nucleico de péptido (APN), un híbrido o una mezcla de los mismos, y puede existir en una forma de doble cadena, de una sola cadena o parcialmente de doble cadena. Entre los ácidos nucleicos de la invención se incluyen tanto ácidos nucleicos como fragmentos de los mismos, en formas purificadas o no purificadas, incluyendo genes, cromosomas, plásmidos, los genomas de material biológico, tal como microorganismos, por ejemplo bacterias, levaduras, virus, viroides, mohos, hongos, plantas, animales, seres humanos y similares.

No se pretende realizar ninguna distinción de longitud entre las expresiones ácido nucleico, nucleótido, polinucleótido y oligonucleótido, y estas expresiones se utilizarán intercambiabilmente. Estas expresiones incluyen ADN de

doble cadena y de una cadena, así como ARN de doble cadena y de una cadena. Aunque los oligonucleótidos pueden presentar cualquier longitud, pueden presentar menos de 500 nucleótidos, por ejemplo 5 a 100, 10 a 100, 10 a 30, 15 a 30 ó 15 a 50 nucleótidos.

5 Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se utilizan intercambiabilmente en la presente memoria para hacer referencia a un polímero de residuos aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos aminoácidos es un mimético químico artificial de un aminoácido natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos naturales y polímeros de aminoácidos no naturales.

10 El término “aminoácido” se refiere a aminoácidos naturales y sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y a miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos naturales. Los aminoácidos naturales son aquellos codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que resultan posteriormente modificados, por ejemplo hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refie-
15 ren a compuestos que presentan la misma estructura química básica que un aminoácido natural, es decir, un carbono que se encuentra unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metilsulfonio de metionina. Dichos análogos presentan grupos R modificados (por ejemplo norleucina) o esqueletos peptídicos modificados, pero conservan la misma estructura química básica del aminoácido natural. Los miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que presentan una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de una manera similar a un
20 aminoácido natural.

Se puede hacer referencia a los aminoácidos en la presente memoria por sus comúnmente conocidos símbolos de tres letras, o por los símbolos de una letra recomendados por la comisión de nomenclatura bioquímica IUPAC-IUB. De manera similar, puede hacerse referencia a los nucleótidos por sus códigos de una letra comúnmente aceptados.

25 La expresión “se hibrida selectivamente (o específicamente)” se refiere a la unión, duplicación o hibridación de una molécula predominantemente (por ejemplo por lo menos 50% de la molécula hibridante) con una secuencia particular de nucleótidos bajo condiciones astringentes de hibridación encontrándose presente la secuencia en una mezcla compleja (por ejemplo ADN o ARN total celular o de una biblioteca). Los polinucleótidos cebadores se hibridan espe-
30 cíficamente a un polinucleótido molde en una reacción de amplificación (por ejemplo a una temperatura de hibridación de aproximadamente 60°C) al amplificar los cebadores el molde en una mezcla de reacción que comprende una mezcla compleja de polinucleótidos (por ejemplo aislado a partir de una célula) para producir un producto de amplificación que es por lo menos el producto de amplificación más predominante Y preferentemente el único producto de amplifi-
cación significativo (por ejemplo que represente por lo menos 90% a 95% de todos los productos de amplificación en la muestra) de la reacción.

La expresión “condiciones astringentes de hibridación” se refiere a condiciones bajo las que una sonda se hibridará predominantemente a su subsecuencia diana en una mezcla compleja de ácidos nucleicos. Las condiciones astringentes son dependientes de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Las secuencias más largas se hibridan
40 específicamente a temperaturas más altas. Puede encontrarse una guía extensa de la hibridación de ácidos nucleicos en: Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Probes, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays”, 1993. Generalmente, las condiciones astringentes se selecciona que sean aproximadamente 5°C a 10°C más bajas que el punto de fusión térmica (T_m) de la secuencia específica a un pH a una fuerza iónica definida. La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica, pH y concentración de
45 ácidos nucleicos definidos) a la que 50% de las sondas complementarias a la diana se hibridan con la secuencia diana en el equilibrio (debido a que las secuencias diana se encuentran presentes en exceso, a la T_m 50% de las sondas se encuentran ocupadas en el equilibrio). Las condiciones astringentes son aquellas en las que la concentración salina es inferior a aproximadamente 1,0 M de ión sódico, típicamente aproximadamente 0,01 a 1,0 M de concentración de ión sódico (o de otras sales) a un pH de entre 7,0 y 8,3, y la temperatura es por lo menos aproximadamente 30°C para las
50 sondas cortas (por ejemplo de 10 a 50 nucleótidos) y de por lo menos aproximadamente 60°C para sondas largas (por ejemplo de más de 50 nucleótidos). También pueden conseguirse condiciones astringentes con la adición de agentes desestabilizadores, tales como la formamida. Para la hibridación selectiva o específica, una señal positiva es por lo menos dos veces la señal de fondo, opcionalmente 10 veces la hibridación de fondo. Unas condiciones de hibridación astringente ejemplares pueden ser las siguientes: formamida al 50%, 5x SSC, y SDS al 1%, incubación a 42°C, o 5x
55 SSC, SDS al 1%, incubación a 65°C, con lavado en 0,2x SSC y SDS al 0,1% a 65°C.

Los ácidos nucleicos que no se hibridan entre sí bajo condiciones astringentes todavía son sustancialmente idénticos en el caso de que los polipéptidos codificados sena sustancialmente idénticos. Esto se produce, por ejemplo, en el caso de que se cree una copia de un ácido nucleico utilizando la máxima degeneración de codones permitida por el
60 código genético. En estos casos los ácidos nucleicos típicamente se hibridan bajo condiciones de hibridación moderadamente astringentes. Entre las “condiciones de hibridación moderadamente astringentes” ejemplares se incluyen la hibridación en un tampón de formamida al 40%, NaCl 1 M, SDS al 1% a 37°C, y un lavado en 1X SSC a 45°C. Una hibridación positiva presenta por lo menos dos veces el nivel de fondo. El experto ordinario en la materia reconocerá fácilmente que pueden utilizarse condiciones de hibridación y de lavado alternativas para proporcionar condiciones de
65 astringencia similares.

Para la PCR, una temperatura de aproximadamente 36°C es típica para la amplificación de baja astringencia, aunque la temperatura de hibridación puede variar entre aproximadamente 32°C y 48°C, dependiendo de la longitud del

cebador. Para la amplificación por PCR de alta astringencia, es típica una temperatura de aproximadamente 62°C, aunque las temperaturas de hibridación de alta astringencia pueden encontrarse comprendidas entre aproximadamente 50°C y aproximadamente 65°C, dependiendo de la longitud y especificidad del cebador. Entre las condiciones de ciclado ejemplares para amplificaciones tanto de alta como baja astringencia se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, una etapa de desnaturalización de entre aproximadamente 30 segundos y aproximadamente 2 minutos a una temperatura de entre 90°C y 95°C, una etapa de hibridación de entre aproximadamente 5 segundos y aproximadamente 2 minutos a una temperatura de entre 50°C y 70°C, y una etapa de extensión de entre aproximadamente 1 minuto y aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 70°C.

El término “anticuerpo” se refiere a un polipéptido que comprende una región marco de un gen de inmunoglobulina o de fragmentos del mismo, que se une y reconoce específicamente un antígeno. Entre los genes de inmunoglobulina reconocidos se incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como la multitud de genes de región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulina IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.

Una unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) ejemplar comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto de dos parejas idénticas de cadenas polipeptídicas, presentando cada pareja una cadena “ligera” (de aproximadamente 25 kDa) y una cadena “pesada” (de aproximadamente 50 a 70 kDa). El extremo N-terminal de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 ó 110, ó más, aminoácidos que es principalmente responsable del reconocimiento de antígeno. Las expresiones cadena ligera variable (V_L) y cadena pesada variable (V_H) se refieren a dichas cadenas ligera y pesada, respectivamente.

Existen anticuerpos, por ejemplo, en forma de inmunoglobulinas intactas, o de varios fragmentos bien caracterizados producidos por la digestión con diversas peptidasas. De esta manera, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo debajo de los enlaces disulfuro en la región bisagra, produciendo $F(ab')_2$, un dímero de Fab que él mismo es una cadena ligera unida a $VH-CH1$ mediante un enlace disulfuro. El fragmento $F(ab')_2$ puede reducirse bajo condiciones suaves para romper el enlace disulfuro en la región bisagra, convirtiendo de esta manera el dímero $F(ab')_2$ en un monómero Fab' . El monómero Fab' es esencialmente Fab con parte de la región bisagra (ver Fundamental Immunology (Paul, editor, 3a edición, 1993). Aunque diversos fragmentos de anticuerpo se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, el experto en la materia apreciará que dichos fragmentos pueden sintetizarse de novo químicamente o mediante la utilización de métodos de ADN recombinante. De esta manera, el término “anticuerpo”, tal como se utiliza en la presente memoria, también incluye fragmentos de anticuerpos producidos mediante la modificación de anticuerpos completos, o los sintetizados *de novo* utilizando métodos de ADN recombinante (por ejemplo Fv de una sola cadena) o aquellos identificados utilizando bibliotecas de expresión fágica (ver, por ejemplo, McCafferty *et al.*, Nature 348:552-554, 1990).

Para la preparación de anticuerpos monoclonales o policlonales, puede utilizarse cualquier técnica conocida de la técnica (ver, por ejemplo, Kohler & Milstein, Nature 256:495-497, 1975; Kozbor *et al.*, Immunology Today 4:72, 1983; Cole *et al.*, páginas 77 a 96, en: Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, 1985). Las técnicas para la producción de anticuerpos de una cadena (patente US nº 4.946.778) pueden adaptarse para producir anticuerpos contra un polipéptido de la presente invención. Además, pueden utilizarse ratones transgénicos, u otros organismos, tales como otros mamíferos, para expresar anticuerpos humanizados. Alternativamente, puede utilizarse tecnología de expresión fágica para identificar anticuerpos y fragmentos Fab heteroméricos que se unan específicamente a antígenos seleccionados (ver, por ejemplo, McCafferty *et al.*, Nature 348:552-554, 1990; Marks *et al.*, Biotechnology 10:779-783, 1992).

La expresión “se une específicamente (o selectivamente)” a un anticuerpo, o “inmunorreactivo específicamente (o selectivamente) con”, en referencia a una proteína o péptido, se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína en una población heterogénea de proteínas y de otros compuestos biológicos. De esta manera, los anticuerpos especificados se unen a una proteína particular por lo menos dos veces más que el nivel de fondo, y no se unen sustancialmente en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra. La unión específica a un anticuerpo bajo dichas condiciones puede requerir un anticuerpo que se selecciona por su especificidad para una proteína particular. Por ejemplo, pueden seleccionarse anticuerpos policlonales cultivados contra SENP1 para obtener únicamente aquellos anticuerpos policlonales que son específicamente inmunorreactivos con SENP1 y no con otras proteínas, excepto por variantes polimórficas y alelos de SENP1. Esta selección puede conseguirse descartando los anticuerpos que reaccionan cruzadamente con las moléculas de SENP1 procedentes de otras especies o que reaccionan cruzadamente con proteínas que no son SENP1. Puede utilizarse una diversidad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, se utilizan rutinariamente inmunoensayos ELISA de fase sólida para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína (ver, por ejemplo, Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, 1988, para una descripción de formatos de inmunoensayo y de condiciones que pueden utilizarse para determinar la inmunorreactividad específica). Típicamente, una reacción específica o selectiva presentará por lo menos dos veces la señal de fondo o de ruido, y más típicamente más de 10 a 100 veces la señal de fondo.

Las expresiones “idéntico” o “identidad del 100%” en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias de polipéptido, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que presentan la misma secuencia. Dos secuencias son “sustancialmente idénticas”, o presentan un determinado porcentaje de identidad en el caso de que dos secuencias

presenten un porcentaje especificado de residuos aminoácidos o nucleótidos que son iguales (es decir, 60% de identidad, opcionalmente 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad en una región especificada o, en el caso de que no se especifique, en la totalidad de la secuencia), en la comparación y alineación para máxima correspondencia en una ventana de comparación, o región designada para la medición utilizando uno de los algoritmos de comparación de secuencias siguientes o mediante alineación manual e inspección visual. La invención proporciona oligonucleótidos que son sustancialmente idénticos a por lo menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 40, 50 ó más nucleótidos contiguos de polinucleótidos SENP1, o polinucleótidos de telomerasa, o complementos de los mismos.

Para la comparación entre secuencias, típicamente una secuencia actúa de secuencia de referencia, a la que se comparan las secuencias de ensayo. Al utilizar un algoritmo de comparación de secuencias, se introducen en un ordenador las secuencias de ensayo y de referencia, se designan coordenadas de subsecuencia, en caso necesario, y se fijan los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. Pueden utilizarse parámetros de programa por defecto, o pueden fijarse parámetros alternativos. A continuación, el algoritmo de comparación de secuencias calcula los porcentajes de identidad de secuencia para las secuencias de ensayo respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

Una “ventana de comparación”, tal como se utiliza en la presente memoria, incluye la referencia a un segmento de cualquiera de entre varias posiciones contiguas seleccionadas de entre el grupo que consiste de entre 5 y 600, habitualmente de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100, más habitualmente de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 50, en la que puede compararse una secuencia a una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas tras alinearse óptimamente las dos secuencias. Los métodos de alineación de secuencias para la comparación son bien conocidos de la técnica. La alineación óptima de secuencias para la comparación puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482c, 1970, mediante el algoritmo de alineación por homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970, mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988, mediante implementaciones computerizadas de dichos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete informático Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) o mediante alineación manual e inspección visual (ver, por ejemplo, Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology* (suplemento de 1995)).

Dos ejemplos de algoritmos que resultan adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencias y la similitud de secuencias son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describe en Altschul *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402, 1977, y Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990, respectivamente. Los programas para llevar a cabo los análisis BLAST se encuentran públicamente disponibles a través del National Center for Biotechnology Information. Este algoritmo implica identificar en primer lugar las parejas de secuencias de elevada puntuación (HSPs) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia de pregunta, que se corresponden o que satisfacen algún umbral de puntuación T de valor positivo al alinearse con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se denomina umbral de puntuación de palabra vecina (Altschul *et al.*, *supra*). Esa palabra vecina inicial actúa como semilla para iniciar búsquedas de HSPs más largas que la contengan. Estas palabras localizadas se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia en la medida en que se incrementa la puntuación acumulativa de alineación. Se calculan las puntuaciones acumuladas utilizando, a modo de secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para una pareja de residuos correspondientes, en todos los casos >0) y N (puntuación de penalización para residuos no correspondientes; en todos los casos <0). Para las secuencias de aminoácidos, se utiliza una matriz de puntuaciones para calcular la puntuación acumulada. La extensión de las palabras localizadas en cada dirección se detiene en cualquiera de los casos siguientes: la puntuación acumulada de puntuación cae en una cantidad X respecto al valor máximo alcanzado; la puntuación acumulada baja a cero o menos; debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos de puntuación negativa; se alcanza el final de cualquiera de las dos secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST, W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLASTN (por “secuencias de nucleótidos”) utiliza como parámetros por defecto una longitud de palabra (W) de 11, un valor esperado (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación entre ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza como valores por defecto una longitud de palabra de 3 y un valor esperado (E) de 10, y alineaciones (B) de matriz de puntuación BLOSUM62 (ver Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915, 1989) de 50, valor esperado (E) de 10, M=5, N=-4, y una comparación entre ambas cadenas. Cualquiera de los programas se ejecuta con el filtro de baja complejidad desactivado (en “off”).

El algoritmo BLAST también lleva a cabo un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (ver, por ejemplo, Karlin y Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5887, 1993). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la suma de probabilidades mínima (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad de que se produzca al azar una correspondencia entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia en el caso de que la suma de probabilidades mínima en una comparación entre el ácido nucleico de ensayo y el ácido nucleico de referencia sea inferior a aproximadamente 0,2, más preferentemente inferior a aproximadamente 0,01, y todavía más preferentemente inferior a aproximadamente 0,001.

Descripción detallada de la invención

I. Introducción

No todos los tumores de un tipo de cáncer dado contienen niveles detectables de actividad de telomerasa (ver, por ejemplo, Shay J.W. y Bacchetti, S. Eur. J. Cancer 33:787-791, 1997; Yan P. *et al.*, Cancer Res. 59:3166-3170, 1999). En general, 50% a 100% de los tumores de diferentes tipos presentan una actividad medible de telomerasa (Bryan T.M., Nature Medicine 3:1271-1274, 1997; Kim N.W. *et al.*, Science 266:2011-2015, 1994; Bacchetti S. y Counter C.M., Int. J. Oncology 7:423-432, 1995). De esta manera, aunque esta falta de detección de actividad de telomerasa podría deberse a una incapacidad para medir niveles bajos, es más probable que la expresión de telomerasa resulte suficiente para causar cáncer, pero que no resulte necesaria. Es decir, algunos tumores podrían no expresar telomerasa activa.

En efecto se ha encontrado que algunas líneas celulares inmortalizadas y tumores son capaces de mantener telómeros sin telomerasa (ver, por ejemplo, Bryan *et al.*, Nature Medicine 3:1271-1274, 1997; Scheel C. y Poremba C., Virchows Arch. 440:573-5782, 2002; McEachern M.J. *et al.*, Annu. Rev. Genet. 34:331-358, 2000). Este alargamiento alternativo de los telómeros (ALT), por lo menos en algunos casos, se produce mediante recombinación homóloga (Dunham M.A. *et al.*, Nature Genetics 26:447-450, 2000). Las células epiteliales aparentemente resultan inmortalizadas por ALT mucho menos frecuentemente que los fibroblastos (Bryan T.M. *et al.*, Nature Medicine 3:1271-1274, 1997; Mehle C. *et al.*, Oncogene 13:161-166, 1996).

Resulta interesante que los cánceres en gran parte son de origen epitelial, lo que podría explicar los porcentajes generalmente altos de tumores que son positivos para telomerasa. Si embargo, debido a que los telómeros de los tumores en algunas poblaciones de pacientes se mantienen mediante un mecanismo independiente de telomerasa, esto establece un límite superior a la sensibilidad que puede alcanzarse con cualquier ensayo basado en una telomerasa diseñado para el diagnóstico o el seguimiento de la recurrencia de un cáncer. Determinados tumores escaparían a la detección utilizando una telomerasa como único marcador de cáncer.

Los inventores reconocieron una necesidad de un método para detectar tumores que no expresan telomerasa. La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que la expresión incrementada de SENP1 es un marcador útil para identificar cánceres que no presentan niveles detectables de telomerasa. De esta manera, mediante la detección de tanto SENP1 como telomerasa en una muestra, resulta posible detectar un número significativo de cánceres. Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos para detectar la presencia de células de cáncer de vejiga en una muestra biológica mediante la determinación de la cantidad de SENP1 y de TERT o TERC en la muestra.

Además, la presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que la expresión incrementada de SENP1 resulta un marcador útil para identificar el cáncer de vejiga. Además, los inventores han demostrado que la utilización de tanto SENP1 como TERC o TERC como marcadores puede proporcionar una mayor sensibilidad y especificidad para detectar cánceres de vejiga que la utilización de cualquiera de los marcadores individualmente. Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos para detectar la presencia de células de cáncer de vejiga en una muestra biológica mediante la determinación de la cantidad de SENP1 y, opcionalmente, de TERT o TERC, en la muestra. De esta manera, en algunas realizaciones de la invención se detectan tanto SENP1 como TERT o TERC, en donde un incremento de cualquiera de los marcadores indica la presencia de cáncer de vejiga.

La presente invención se basa en técnicas rutinarias del campo de la genética recombinante. Entre los textos básicos que proporcionan los métodos generales de utilización en la presente invención se incluyen: Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3a edición, 2001); Kriegl, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual, 1990, y Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, editores, 2002).

II. Detección y cuantificación de SENP1 y/o telomerasa

La presente invención permite utilizar cualquier método de cuantificación de polinucleótidos de SBNP1 y/o TERT o TERC (incluyendo ARNm de SENP1, ADNc de SENP1, ARNm de TERT, ADNc de TERT, ARN de TERC, ADNc de TERC, etc.) y/o polipéptidos ASENp1 y/o TERT o TERC y/o la actividad de SENP1 y/o de TERT o TERC, conocido por el experto en la materia, secuencial o simultáneamente en un ensayo o en múltiples ensayos. Entre los enfoques ejemplares de la detección de SENP1, TERT o TERC se incluyen, por ejemplo, (a) la detección de polinucleótidos de SENP1 o de telomerasa, incluyendo la utilización de ensayos basados en la hibridación y/o la reacción de amplificación de polinucleótidos, (b) la detección de proteínas SENP1 o telomerasa, incluyendo la utilización de ensayos basados en un agente de afinidad que implican un agente que se une específicamente a un polipéptido o polinucleótido de SENP1 o de telomerasa, y/o (c) la detección de la actividad de SENP1 o de telomerasa. La totalidad de estos métodos permite la cuantificación directa o indirecta posterior de las dianas detectadas, es decir, SENP1 y telomerasa.

Típicamente, los polinucleótidos o polipéptidos SENP1 asociados a cáncer detectados en la presente invención son por lo menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más idénticos a la secuencia SEC ID n° 1 o a aquellos polinucleótidos codificantes de la secuencia SEC ID n° 2 o a una o más de las secuencias SENP1 disponibles, por ejemplo de GenBank (ver, por ejemplo, la secuencia de ARNm de SENP en NMR_014554 y el polipéptido SENP1 en NP_055369). De manera similar, los polinucleótidos de telomerasa (por

ejemplo ARN de TERT o TERC) o los polipéptidos telomerasa (por ejemplo TERT) detectados en la presente memoria son aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más idénticos a un polinucleótido o polipéptido de telomerasa. Los polinucleótidos o polipéptidos de SENP o de telomerasa detectados pueden representar formas funcionales o no funcionales del polinucleótido o polipéptido asociado a cáncer, o cualquier variante, derivado o fragmento del mismo. Típicamente, se detecta el nivel y/o presencia de polinucleótidos o polipéptidos asociados a cáncer en una muestra biológica.

Entre los métodos para detectar la expresión de telomerasa pueden incluirse métodos del mismo tipo utilizado para detectar SENP1 (por ejemplo se detectan polinucleótidos tanto de telomerasa como de SENP1) o diferentes métodos (por ejemplo se detectan polinucleótidos de SENP1 y actividad de telomerasa). Sin embargo, para comodidad del usuario, puede resultar deseable utilizar el mismo ensayo de detección tanto para la telomerasa como para SENP1. Por ejemplo en algunas realizaciones, puede utilizarse una reacción multiplex cuantitativa de transcripción inversa-en cadena de la polimerasa (RT-PCR) para cuantificar la expresión tanto de SENP1 como de telomerasa en una muestra. En algunas realizaciones, se lleva a cabo una RT-PCR cuantitativa en tiempo real.

A. Detección de la expresión de ARNm

Pueden llevarse a cabo ensayos de detección en preparaciones que contienen ARNm o ADNc generado a partir de ARNm aislado de una manera que refleje los niveles relativos de transcritos de ARNm en la muestra. Los métodos para detectar ARN de telomerasa han sido descritos y pueden adaptarse generalmente para detectar SENP1 (ver, por ejemplo, las patentes US n° 6.582.965, n° 5.846.723, n° 6.607.898; publicación de patente US n° 2002/0012969, y Angelopoulou *et al.*, Anticancer Res. 23:4821-4829, 2003).

1. Ensayos basados en la amplificación

a. Métodos de detección

En algunas realizaciones, pueden determinarse los niveles de ARN utilizando reacciones de amplificación, tales como la PCR. Por ejemplo, puede utilizarse uno o más cebadores oligonucleótidos para amplificar una región de un polinucleótido SENP1 (por ejemplo un ADNc de SENP1 o de telomerasa). Entre las reacciones de amplificación que resultan útiles para la presente invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la reacción en cadena de la ligasa (LCR) (ver las patentes US n° 4.683.195 y n° 4.683.202; PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications (Innit *et al.*, editor, 1990)), la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) (Walker *et al.*, Nucleic Acids Res. 20:1691-1696, 1992; Walker, PCR Methods Appl. 3:1-6, 1993), la amplificación mediada por la transcripción (Phyffer *et al.*, J. Clin. Microbiol. 34:834-841, 1996; Vuorinen *et al.*, J. Clin. Microbiol. 33:1856-1859, 1995), la amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico (NASBA) (Compton, Nature 350:91-92, 1995), la amplificación de círculo rodante (RCA) (Lisby, Mol. Biotechnol. 12:75-99, 1999; Hatch *et al.*, Genet. Anal. 15:35-40, 1999), la amplificación de señal de ADN ramificado (ADNb) (ver, por ejemplo, Iqbal *et al.*, Mol. Cell Probes 13:315-320, 1999, y la replicasa Q-beta (Lizardi *et al.*, Biotechnology 6:1197, 1988).

Aunque puede utilizarse cualquier tipo de reacción de amplificación, en algunas realizaciones se utiliza PCR para amplificar ADN molde. Los cebadores de PCR típicamente se diseñan para hibridarse específicamente al polinucleótido de SENP1, por ejemplo bajo condiciones utilizadas en una reacción de PCR. Por ejemplo, los cebadores típicamente se hibridan en tampones de PCR estándares (tales como, aunque sin limitación, aquellos que contienen bicina 50 mM, pH 8,0, acetato de potasio 115 mM, glicerol al 8%, acetato de manganeso 3 mM, 200 μ M de cada desoxiadenosina trifosfato, desoxicitina trifosfato, desoxiguanosina trifosfato y 500 μ M de desoxiuridina trifosfato, 2 unidades de uracil-N-glucosilasa (UNG), 10 unidades de ADN polimerasa, 200 nM de cada cebador, directo e inverso, y opcionalmente una sonda polinucleótida) a aproximadamente 60°C. Generalmente los cebadores se diseñan y/o se someten a ensayo para evitar una homología o hibridación significativa con otros polinucleótidos probablemente presentes en la muestra biológica (por ejemplo en el genoma humano). También se han descrito y pueden utilizarse métodos alternativos de amplificación (por ejemplo LCR, SDA, RCA, Q-beta, etc.).

En algunas realizaciones, puede detectarse ARN de SENP1 o de telomerasa utilizando transcriptasa inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Los métodos de RT-PCR son bien conocidos por el experto en la materia (ver, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel *et al.*, editores, 2002).

Los métodos de amplificación utilizados para detectar polinucleótidos de SENP1 pueden implicar una metodología de PCR cuantitativa tal como, por ejemplo, la PCR en tiempo real, incluyendo la RT-PCR cuantitativa. Los métodos de amplificación cuantitativa se dan a conocer en, por ejemplo, las patentes US n° 6.180.349, n° 6.033.854 y n° 5.972.602, así como en, por ejemplo, Gibson *et al.*, Genoma Research 6:995-1001, 1996; DeGraves *et al.*, Biotechniques 34:106-110, 112-115, 2003; Deiman B. *et al.*, Mol. Biotechnol. 20:163-179, 2002). Para cuantificar la cantidad de ARN específico en una muestra, puede generarse una curva estándar a partir de la transcripción run-off de un plásmido que contiene el gen de interés. Pueden generarse curvas estándar utilizando los valores umbral (C_t), determinados en la PCR en tiempo real, que se relacionan con la concentración inicial de ADNc utilizada en el ensayo. Además, puede generarse una curva estándar para un polinucleótido estándar (por ejemplo una secuencia anteriormente cuantificada). Esto permite la estandarización del contenido inicial de ARN de una muestra biológica respecto a la cantidad de estándar con fines comparativos (ver, por ejemplo, The PCR Technique: Quantitative PCR, J. Larrick (editor), 1997).

Un método de detección de productos de amplificación es el ensayo de PCR de 5' nucleasa (utilizando, por ejemplo, Cobas TaqMan 48 Analyzer™ (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA)) (ver, por ejemplo, Holland *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7276-7280, 1991; Lee *et al.*, Nucleic Acids Res. 21:3761-3766, 1993; patentes US nº 6.214.979, nº 5.804.375, nº 5.487.972 y nº 5.210.015). Este ensayo detecta la acumulación de un producto de PCR específico mediante hibridación y corte de una sonda doblemente marcada fluorogénica durante la reacción de amplificación. La sonda fluorogénica puede consistir de un oligonucleótido (por ejemplo que se hibrida a un polinucleótido de SENP1 o de telomerasa o el complemento del mismo) marcado con un pigmento informador fluorescente y un pigmento desactivador. Durante la PCR, esta sonda es cortada por la actividad 5' nucleasa de la ADN polimerasa, sólo y sólo si se hibrida con el segmento que se amplifica. El corte de la sonda genera un incremento de la intensidad de fluorescencia del pigmento informador.

En algunas realizaciones, los enzimas con actividad de 5' nucleasa son ácido nucleico polimerasas termoactivas y termoestables. Entre dichas polimerasas termoestables se incluyen, aunque sin limitación, formas nativas y recombinantes de polimerasas procedentes de una diversidad de especies de los géneros eubacterianos *Thermus*, *Thermatoga* y *Thermosipho*. Por ejemplo, entre las polimerasas de las especies de *Thermus* que pueden utilizarse en los métodos de la invención se incluyen la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq), la ADN polimerasa de *Thermus thermophilus* (Th), la ADN polimerasa de *Thermus* especie Z05 (Z05), la ADN polimerasa de *Thermatoga maritima*, la ADN polimerasa de *Thermatoga neapolitana* y de la especie de *Thermus* sps 17 (sps17), tal como se describe en las patentes US nº 5.405.774, nº 5.352.600, nº 5.079.352, nº 4.889.818, nº 5.466.591, nº 5.618.711, nº 5.674.738 y nº 5.795.762.

Otro método de detección de productos de amplificación que se basa en la utilización de transferencia de energía es el método de la "baliza molecular" de Tyagi y Kramer (Nature Biotech. 14:303-309, 1996) que también es el objeto de las patentes US nº 5.119.801 y nº 5.312.728. Este método utiliza sondas oligonucleótidas de hibridación que pueden formar estructuras de horquilla. En un extremo de la sonda de hibridación (en el extremo 5' o 3') existe un fluoróforo donante, y en el otro extremo, un grupo aceptor. En el caso del método de Tyagi y Kramer, este grupo aceptor es un desactivador, es decir, el aceptor absorbe la energía liberada por el donante, pero él mismo no emite fluorescencia. De esta manera, en el caso de que la baliza se encuentre en conformación abierta, la fluorescencia del fluoróforo donante es detectable, mientras que, en el caso de que la baliza se encuentre en la conformación de horquilla (cerrada), se desactiva la fluorescencia del fluoróforo donante. Al utilizarlas en una PCR, la baliza molecular que se hibrida con una de las cadenas del producto de PCR se encuentra en "conformación abierta" y se detecta la fluorescencia, mientras que aquellas que quedan no hibridadas no emiten fluorescencia (Tyagi y Kramer, Nature Biotechnol. 14:303-306, 1996). Como resultado, la cantidad de fluorescencia se incrementa a medida que se incrementa la cantidad de producto de PCR, y de esta manera puede utilizarse como medida del progreso de la PCR. El experto en la materia reconocerá que también se encuentran disponibles otros métodos de amplificación cuantitativa. Entre otros tipos de sondas útiles para los métodos de PCR en tiempo real se incluyen las sondas Scorpion™, que se encuentran disponibles en formatos "unimarcados" y "bimarcados", de Prolog, C (Boulder, CO) (ver también Bates *et al.*, Mol. Pliant Pathol. 2:275-280, 2001).

En todavía otro ejemplo, pueden utilizarse dos cebadores y una sonda de la invención para detectar y cuantificar un ácido nucleico diana utilizando la amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico (NASBA). En algunos métodos de NASBA, se utilizan tres enzimas, incluyendo la transcriptasa inversa, la ARN polimerasa de T7 y la ARNasa H. El producto de amplificación final es ARN de una cadena con una polaridad contraria a la del ácido nucleico que debe detectarse. El producto de ARN amplificado puede detectarse en algunas realizaciones mediante la utilización de una sonda de captura específica de una diana unida a partículas magnéticas conjuntamente con una sonda detectora marcada con rutenio y un instrumento (NucliSens Reader, bioMérieux) capaz de medir la electroquimioluminiscencia (ECL). Alternativamente, el ARN amplificado mediante NASBA puede detectarse específicamente en tiempo real mediante la inclusión de balizas moleculares en la reacción de amplificación, tal como se ha indicado anteriormente. Puede encontrarse directrices adicionales sobre la utilización de los cebadores y sondas de la invención en artículos por Compton, Nature 350:91-92, 1991, y Kievits *et al.*, J. Virol. Methods 35:273-286, 1991.

Otro ejemplo de métodos que utilizan un ácido nucleico cebador y una sonda para detectar y cuantifica un ácido nucleico diana implican la utilización de nanopartículas. En estos métodos, dos oligonucleótidos, tales como un cebador o sonda de la invención, que pueden hibridarse con regiones diferentes de un ácido nucleico que debe detectarse, se unen covalentemente a una nanopartícula. Las nanopartículas se ponen en contacto con un ácido nucleico diana bajo condiciones de hibridación. En el caso de que el ácido nucleico se encuentre presente, éste se unirá a los oligonucleótidos unidos a las nanopartículas, produciendo un complejo de gran peso molecular que puede detectarse. El complejo puede detectarse mediante cualquier método conocido por el experto en la materia sin limitación. En determinadas realizaciones, el complejo se detecta mediante precipitación del complejo. En determinadas realizaciones, se detecta el complejo mediante precipitación del complejo. Pueden encontrarse directrices adicionales sobre métodos de utilización de nanopartículas en relación a los cebadores y sondas de la invención en Taton *et al.*, Science 289:1757-1760, 2000, y las patentes US nº 6.506.564, nº 6.495.324, nº 6.417.340, nº 6.399.303 y nº 6.361.944.

En todavía otro ejemplo, puede utilizarse la amplificación de círculo rodante ("RCA") como parte de un método para detectar y cuantificar un ácido nucleico diana. En determinadas realizaciones de métodos RCA, se amplifica un ADN circular mediante extensión por polimerasa de un cebador complementario. Puede utilizarse cualquiera de los cebadores o sondas de la invención en dichos métodos. Los métodos de circularización del ADN son bien conocidos de la técnica y entre ellos se incluyen, por ejemplo, la ligación de los extremos de una molécula de ADN bajo condiciones que favorecen la ligación intramolecular. El producto concatámero de una cadena seguidamente puede detectarse mediante cualquier método de detección de ácidos nucleicos conocido por el experto en la materia sin limitación. Por

ejemplo, el producto concatámero puede detectarse utilizando una sonda detectablemente marcada de la invención. Otros ejemplos de métodos para detectar un ácido nucleico de secuencia conocida se describe extensivamente en la presente memoria. En otras realizaciones del RCA, puede utilizarse un segundo cebador que es complementario al producto concatámero. Este cebador permite la amplificación exponencial de las secuencias presentes en el ADN molde circular. Los productos de la amplificación todavía pueden detectarse, por ejemplo, mediante la utilización de una sonda detectablemente marcada de la invención. Pueden encontrarse directrices adicionales sobre la utilización de cebadores y sondas de la invención en los métodos RCA para la detección de un ácido nucleico diana en las patentes US nº 6.344.329, nº 6.350.580, nº 6.221.603, nº 6.210.884, nº 5.648.245 y nº 5.714.320 y la patente WO nº 95/35390.

En otro ejemplo de dichos métodos, puede detectarse y amplificarse un ácido nucleico diana utilizando la amplificación por desplazamiento de cadena ("SDA"). En estos métodos, se detectan los ácidos nucleicos amplificados mediante la incorporación de un cebador de una cadena que comprende un grupo fluorescente, un grupo desactivador, y un sitio de restricción introducido que separa los dos grupos. El experto en la materia podrá reconocer fácilmente cómo modificar cualquiera de los cebadores o sondas de la invención para la utilización en la SDA.

En una primera reacción de amplificación utilizada en la SDA, el cebador se utiliza para amplificar un ácido nucleico diana en presencia de, por ejemplo, tio-dCTP, incorporando de esta manera el cebador en el producto de amplificación. A continuación, puede utilizarse una endonucleasa de restricción para cortar el sitio de restricción en el cebador. La endonucleasa de restricción no puede cortar ambas cadenas del producto de amplificación debido a la incorporación de tio-dCTP en el producto de amplificación. Finalmente, el extremo 3' del cebador creado por el corte puede utilizarse para cebador una nueva reacción de polimerización, desplazando de esta manera la parte de la cadena 3' respecto al corte de la cadena de molde. El desplazamiento de la cadena separa el grupo fluorescente del grupo desactivado, evitando de esta manera la desactivación de la fluorescencia emitida por el grupo fluorescente. De esta manera puede detectarse y/o cuantificarse un polinucleótido de SENP1 o de telomerasa mediante la medición de la presencia y/o cantidad de la fluorescencia. Pueden encontrarse directrices adicionales sobre la selección y modificación de cebadores y sondas para la utilización en la SDA en Little *et al.*, Clin. Chem. 45:777-784, 1999, y en las patentes US nº 6.528.254 y nº 6.528.632.

En otro ejemplo, puede detectarse y cuantificarse un polinucleótido de SENP1 o de telomerasa utilizando amplificación mediada por la transcripción ("TMA"). TMA es un sistema de amplificación por transcripción de ARN que utiliza la ARN polimerasa y la transcriptasa inversa para amplificar los ácidos nucleicos que deben detectarse. En el método se utiliza un cebador de la invención con un promotor para la ARN polimerasa para cebar la transcripción inversa de un ARN diana. A continuación, la actividad de ARNasa de la transcriptasa inversa degrada el molde de ARN, liberando la cadena de ADNc. La síntesis de la segunda cadena se ceba con un segundo cebador de la invención y es catalizada por una transcriptasa inversa. La ARN polimerasa seguidamente reconoce el promotor sintetizado en la segunda cadena y cataliza múltiples ciclos de transcripción del ARN a partir de la segunda cadena. El producto ARN seguidamente puede detectarse o puede servir como molde para otra ronda de amplificación.

A continuación, el producto ARN de la TMA puede detectarse y amplificarse mediante cualquier método conocido por un experto en la materia. En determinadas realizaciones, el producto ARN puede detectarse con una sonda de la invención. En otras realizaciones, el producto ARN puede detectarse con una sonda de la invención que ha sido marcada con un marcaje de éster de acridina (Gen-Probe Inc., San Diego, CA). Dichos marcajes pueden eliminarse químicamente de la sonda no hibridada, mientras que los marcajes en las sondas hibridadas no se alteran. De esta manera, en este tipo de realizaciones, la presencia de un ácido nucleico diana puede detectarse mediante la detección de la presencia del marcaje de éster de acridina. Pueden encontrarse directrices adicionales para la utilización de los cebadores y sondas de la invención en métodos basados en TMA en Arnold *et al.*, Clin. Chem. 35:1588-1594, 1989; Miller *et al.*, J. Clin. Microbiol. 32:393-397, 1994, y en las patentes US nº 6.335.166 y nº 6.294.338. En otras realizaciones, puede utilizarse cualquier ensayo conocido por un experto en la materia que utiliza un único cebador o sonda de ácidos nucleicos que puede hibridarse con un ácido nucleico para detectar un polinucleótido de SENP1 o de telomerasa. Por ejemplo, puede detectarse un polinucleótido de SENP1 o de telomerasa utilizando un cebador para iniciar una reacción de extensión de cebador. La extensión con éxito del cebador por parte de un ácido nucleico polimerasa indica la presencia del polinucleótido de SENP1 o de telomerasa. Otros ejemplos de métodos de detección de único cebador o sonda que describen métodos que pueden utilizarse tal como se describe, o ser adaptados por un experto en la materia, para detectar un polinucleótido de SENP1 o de telomerasa pueden encontrarse en las patentes US nº 6.440.707, nº 6.379.888, nº 6.368.803, nº 6.365.724, nº 6.361.944, nº 6.352.827, nº 6.326.145, nº 6.312.906, nº 6.268.128, nº 6.261.784, nº 6.177.249, nº 6.140.055, nº 6.130.047, nº 6.124.090, nº 6.121.001, nº 6.110.677, nº 6.054.279, nº 6.022.686, nº 5.981.176, nº 5.958.700, nº 5.945.283, nº 5.935.791, nº 5.919.630, nº 5.888.739, nº 5.888.723, nº 5.882.867, nº 5.876.924, nº 5.866.336, nº 5.856.092, nº 5.853.990, nº 5.846.726, nº 5.814.447, nº 5.808.036, nº 5.800.989, nº 5.795.718, nº 5.792.614, nº 5.710.028, nº 5.683.875, nº 5.683.872, nº 5.679.510, nº 5.641.633, nº 5.597.696, nº 5.595.890, nº 5.571.673, nº 5.547.861, nº 5.525.462, nº 5.514.546, nº 5.491.063, nº 5.437.977, nº 5.294.534, nº 5.118.605, nº 5.102.784, nº 4.994.373, nº 4.851.331 y nº 4.767.700.

b. Cebadores de la invención

Los cebadores oligonucleótidos ejemplares pueden comprender una secuencia por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% idéntica a por lo menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 40, 50 u otro número de nucleótidos contiguos de polinucleótidos de SENP1 o de telomerasa (por ejemplo TERC o TERT) o de complementos de los mismos.

La longitud y composición de la sonda puede seleccionarse para proporcionar suficiente estabilidad termodinámica para garantizar la hibridación de la sonda al ácido nucleico molde bajo condiciones de reacción apropiadas, que dependen del método de detección que se llevará a cabo. Por ejemplo, las sondas con nucleótidos modificados, no estándares o derivatizados pueden ser más largas o cortos que aquellas con nucleótidos convencionales, presentando propiedades termodinámicas de hibridación similares. Pueden encontrarse ejemplos de dichas bases no estándares en las patentes US n° 6.320.005, n° 6.174.998, n° 6.001.611 y n° 5.990.303. A modo de otro ejemplo, las sondas con secuencias ricas en G/C pueden hibridarse con secuencias diana a temperaturas más altas que una sonda de longitud similar con secuencias ricas en A/T.

c. Sondas de la invención

Las sondas oligonucleótidas detectablemente marcadas ejemplares pueden comprender una secuencia por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% idénticas a por lo menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 40, 50 u otro número de nucleótidos contiguos de polinucleótidos de SENP1 o de telomerasa (por ejemplo TERC o TERT) o de complementos de los mismos.

Además de la secuencia de nucleótidos de la sonda tal como se ha indicado en la presente memoria, la sonda puede comprender secuencias de nucleótidos adicionales u otros grupos que no inhiban los métodos de la presente invención. En algunas realizaciones de la invención, la sonda puede comprender secuencias de nucleótidos adicionales u otros grupos que faciliten los métodos de la presente invención. Por ejemplo, la sonda puede bloquearse en su extremo 3' terminal para impedir el cebado de polimerización de ácidos nucleicos por parte de la sonda. Además, pueden encontrarse presentes grupos dentro de la sonda que estabilicen o desestabilicen la hibridación de la sonda o de fragmentos de la misma con la secuencia de nucleótidos. Las sondas de la invención también pueden comprender nucleótidos modificados, no estándares o derivatizados tal como se ha definido anteriormente.

En determinadas realizaciones de la invención la sonda puede comprender un grupo detectable. El grupo detectable puede ser cualquier grupo detectable conocido por un experto en la materia sin limitación. Además, el grupo detectable puede ser detectable mediante cualquier medio conocido por el experto en la materia sin limitación. Por ejemplo, el grupo detectable puede ser detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos.

Una diversidad de grupos detectables que pueden utilizarse para detectar las sondas de la invención, así como métodos para su unión a la sonda, son conocidos de la técnica, y entre ellos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, grupos fluorescentes, cromóforos, marcajes quimioluminiscentes, marcajes electroquimioluminiscentes, tales como OriginTM (Igen, Rockville, MD), ligandos que presentan parejas de unión específicos, o cualquier otro marcaje que pueda interactuar con para incrementar, alterar o reducir una señal. Evidentemente, en el caso de que se lleve a cabo una reacción de 5' nucleasa utilizando una ADN polimerasa termoestable a temperaturas elevada, en algunas realizaciones, el grupo detectable no se degrada o, de otro modo, se convierte en indetectable por dichas temperaturas elevadas. En determinadas realizaciones, el grupo detectable puede ser un grupo fluorescente. El grupo fluorescente puede ser cualquier grupo fluorescente conocido por el experto en la materia sin limitación. En algunas realizaciones, se utilizan grupos fluorescentes con desplazamientos de Stokes amplios, permitiendo la utilización fluorímetros con filtros y no monocromómetros, e incrementar la eficiencia de la detección. En determinadas realizaciones, el grupo fluorescente puede seleccionarse de entre el grupo que consiste de los pigmentos de la familia de la fluoresceína (Integrated ADN Technologies Inc., Coralville, IA), pigmentos de la familia de polihalofluoresceína, pigmentos de la familia de la hexaclorofluoresceína, pigmentos de la familia de la coumarina (Molecular Probes Inc., Eugene, OR), pigmentos de la familia de la rodamina (Integrated ADN Technologies Inc.), pigmentos de la familia de la cianina, pigmentos de la familia de la oxazina, pigmentos de la familia de la tiazina, pigmentos de la familia de la escuarina, pigmentos de la familia de los lantánidos quelados y pigmentos de la familia de BODIPY[®] (Molecular Probes Inc.). En algunas realizaciones, el grupo fluorescente es la 6-carboxifluoresceína (FAMTM) (Integrated ADN Technologies Inc.). Otros ejemplos de grupos fluorescentes que pueden utilizarse en las sondas, métodos y kits de la invención pueden encontrarse en las patentes US n° 6.406.297, n° 6.221.604, n° 5.994.063, n° 5.808.044, n° 5.880.287, n° 5.556.959 y n° 5.135.717. En otras realizaciones, el grupo detectable puede ser un grupo detectable diferente de un grupo fluorescente. Entre los grupos radioactivos resultan preferentes los compuestos marcados con ³²P. Puede utilizarse cualquier método conocido por el experto en la materia sin limitación para introducir ³²P en una sonda. Por ejemplo, puede marcarse una sonda con ³²P mediante marcaje 5' con una quinasa o mediante inserción aleatoria mediante corte y marcado ("nick translation"). Los grupos detectables que son enzimas típicamente pueden detectarse a partir de su actividad. Por ejemplo, la fosfatasa alcalina puede detectarse mediante la medición de la fluorescencia producida por la acción del enzima sobre compuestos de sustrato apropiados. En el caso de que se utilice un miembro de parejas de unión específicas como grupo detectable, la presencia de la sonda puede detectarse mediante la detección de la unión específica de una molécula al miembro de la pareja de unión específica. Por ejemplo, puede unirse un antígeno a la sonda, y utilizarse un anticuerpo monoclonal específico para ese antígeno para detectar la presencia del antígeno y, por lo tanto, de la sonda. Entre otras parejas de unión específica que pueden utilizarse como grupos detectables se incluyen biotina y avidina o estreptavidina, IgG y proteína A, y numerosas otras parejas de receptor-ligando bien conocidas de la técnica. Todavía otros ejemplos de grupos detectables que no son grupos fluorescentes pueden encontrarse en las patentes US n° 5.525.465, n° 5.464.746, n° 5.424.414 y n° 4.948.882.

La descripción anteriormente proporcionada de grupos detectables no pretende categorizar los diversos marcajes en clases diferentes, debido a que el mismo marcaje puede servir en varios modos diferentes. Por ejemplo, ¹²⁵I puede

servir como grupo radioactivo o como reactivo electrodenso. La peroxidasa de rábano picante puede servir como enzima o como antígeno para un anticuerpo monoclonal. Además, pueden combinarse diversos grupos detectables para un efecto deseado. Por ejemplo, puede marcarse una sonda con biotina, y detectarse su presencia con avidina marcada con ^{125}I , o con un anticuerpo monoclonal anti-biotina marcado con peroxidasa de rábano picante. Otras permutaciones y posibilidades resultarán fácilmente evidentes para el experto ordinario en la materia, y se consideran equivalentes comprendidos dentro del alcance de la presente invención.

El método de unión o conjugación del grupo detectable con la sonda depende, evidentemente, del tipo de grupo o grupos detectables utilizados y de la posición del grupo detectable en la sonda.

El grupo detectable puede unirse a la sonda directa o indirectamente mediante una diversidad de técnicas. Dependiendo del tipo exacto de grupo detectable utilizado, éste puede localizarse en el extremo 5' o 3' de la sonda, internamente en la secuencia de nucleótidos de la sonda, o unido a brazos espaciadores de diversos tamaños y composiciones para facilitar las interacciones de señales. Mediante la utilización de reactivos fosforamídita disponibles comercialmente pueden producirse oligonucleótidos que contienen grupos funcionales (por ejemplo tioles o aminas primarias) en cualquiera de los extremos mediante una fosforamídita apropiadamente protegida, y puede unirse a la misma un grupo detectable utilizando protocolos descritos en, por ejemplo, Innis *et al.* (editores), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, 1990).

Los métodos para introducir reactivos funcionalizadores de oligonucleótido para la introducción de uno o más grupos sulfhidrilo, amino o hidroxilo en la secuencia de la sonda oligonucleótido, típicamente en el extremo 5', se describen en la patente US nº 4.914.210. Puede introducirse un grupo 5' fosfato a modo de isótopo radioactivo mediante la utilización de polinucleótido quinasa y $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ para proporcionar un grupo informador. Puede añadirse biotina en el extremo 5' mediante la reacción de un residuo aminotimidina o de un líker alquilamino, introducido durante la síntesis, con un N-hidroxisuccinimida éster de biotina. Otros métodos de unión de un grupo detectable, incluyendo un grupo fluorescente, a la sonda pueden encontrarse en la patente US nº 5.118.802.

También resulta posible unir un grupo detectable en el extremo 3' de la sonda mediante la utilización, por ejemplo, de polinucleótido transferasa terminal para añadir un grupo deseado, tal como, por ejemplo, cordicepín ^{35}S -dATP, y dUTP biotinilado. Los derivados oligonucleótidos también son grupos detectables que pueden utilizarse en las sondas, métodos y kits de la presente invención. Por ejemplo, eteno-dA y eteno-A son nucleótidos adenina fluorescentes conocidos que pueden incorporarse en una sonda oligonucleótida. De manera similar, eteno-dC es otro análogo que podría utilizarse en la síntesis de una sonda. Las sondas que contienen dichos derivados de nucleótidos pueden degradarse para liberar mononucleótidos que son mucho más fuertemente fluorescentes que la sonda intacta mediante, por ejemplo una actividad 5' a 3' nucleasa de polimerasa.

En determinadas realizaciones de la invención, puede marcarse una sonda con más de un grupo detectable. En algunas de dichas realizaciones, cada grupo detectable puede unirse individualmente a diferentes bases de la sonda. En otras realizaciones, puede unirse más de un grupo detectable a la misma base de la sonda.

En determinadas realizaciones, el grupo detectable puede unirse al extremo 5' de la sonda. En otras realizaciones, el grupo detectable puede unirse a la sonda en un residuo que se encuentra a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40 residuos u otro número de residuos del extremo 5' de la sonda. El grupo detectable puede unirse a cualquier parte de un residuo de la sonda. Por ejemplo, el grupo detectable puede unirse a un grupo azúcar, fosfato, o base de un nucleótido en la sonda. En otras realizaciones, el grupo detectable puede unirse entre dos residuos de la sonda.

En determinadas realizaciones de la invención, la sonda puede comprender un grupo fluorescente y un grupo desactivador. En dichas realizaciones, el grupo fluorescente puede ser cualquier grupo fluorescente conocido por el experto en la materia, tal como se ha indicado anteriormente. Además, el grupo desactivador puede ser cualquier grupo desactivador conocido por el experto en la materia sin limitación. En determinadas realizaciones, el grupo desactivador puede seleccionarse de entre el grupo que consiste de pigmentos de la familia de la fluoresceína, pigmentos de la familia de la polihalofluoresceína, pigmentos de la familia de la hexaclorofluoresceína, pigmentos de la familia de la coumarina, pigmentos de la familia de la rodamina, pigmentos de la familia de la cianina, pigmentos de la familia de la oxazina, pigmentos de la familia de la tiazina, pigmentos de la familia de la escuarina, pigmentos de la familia de los lantánidos quelados, pigmentos de la familia de BODIPY[®] y grupos desactivadores no fluorescentes. En determinadas realizaciones, los grupos desactivadores no fluorescentes pueden ser pigmentos de la familia de BHQTM, Iowa BlackTM o Dabcyl (Integrated ADN Technologies Inc.). Entre otros ejemplos de grupos desactivadores específicos se incluyen, por ejemplo, aunque no en modo limitativo, TAMRA (N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirrodamina) (Molecular Probes Inc.), DABCYL (ácido 4-(4'-dimetilaminofenilazo)benzoico), Iowa Black TM (Integrated ADN Technologies Inc.), Cy3TM (Integrated ADN Technologies Inc.) o Cy5TM (Integrated ADN Technologies Inc.). En una realización preferente, el grupo desactivador es Cy5TM. Otros ejemplos de grupos desactivadores que pueden utilizarse en las sondas, métodos y kits de la invención pueden encontrarse en las patentes US nº 6.399.392, nº 6.348.596, nº 6.080.068 y nº 5.707.813, cada una de las cuales se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad.

En determinadas realizaciones, el grupo desactivador puede unirse al extremo 3' de la sonda. En otras realizaciones, el grupo desactivador puede unirse a la sonda en un residuo que se encuentra a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40 u otro

número de residuos del extremo 5' de la sonda. En una realización preferente, el grupo fluorescente se encuentra unido al extremo 5' de la sonda y el grupo desactivador se encuentra unido a un residuo que se encuentra a aproximadamente 9 ó menos residuos del extremo 5' de la sonda. El grupo desactivador puede unirse a cualquier parte de un residuo de la sonda. Por ejemplo, el grupo desactivador puede unirse a un grupo sacárido, fosfato o base de un nucleótido en la sonda. En otras realizaciones, el grupo desactivador puede unirse entre dos residuos de la sonda.

Aunque sin pretender restringirse a ninguna teoría o mecanismo de acción en particular, se cree que, en el caso de que la sonda se encuentre intacta, un fotón emitido por el grupo fluorescente puede ser absorbido y de esta manera aceptado por el grupo desactivador. El grupo desactivador seguidamente libera la energía del fotón en forma de un fotón de diferente longitud de onda o en forma de calor. De esta manera, el grupo desactivador también puede ser un grupo fluorescente. Tal como se ha indicado anteriormente, este fenómeno se denomina transferencia de energía por resonancia fluorescente ("FRET"). El corte de la sonda entre el grupo fluorescente y el desactivador resulta en una reducción de la captación de la fluorescencia emitida por el grupo fluorescente por parte del grupo desactivador.

Generalmente, la transferencia de energía entre el grupo fluorescente y el grupo desactivador depende de la distancia entre el grupo fluorescente y el grupo desactivador y de la distancia crítica de transferencia de la pareja particular de grupo fluorescente-grupo desactivador. La distancia crítica de transferencia es tanto característica como constante para un grupo fluorescente dado apareado con un grupo desactivador dado. Además, la reacción espacial del grupo fluorescente en referencia al grupo desactivador puede determinarse más sensiblemente en el caso de que la distancia crítica de transferencia de la pareja de grupo fluorescente-grupo desactivador se encuentre próxima a la distancia entre el grupo fluorescente y el grupo desactivador. Por consiguiente, el experto en la materia puede seleccionar el grupo fluorescente y el grupo desactivador para que presenten una distancia crítica de transferencia que se encuentre próxima a la distancia que separa el grupo fluorescente del grupo desactivador en la sonda. Las distancias críticas de transferencia de parejas particulares de grupo fluorescente-grupo desactivador son bien conocidas del a técnica y pueden encontrarse, por ejemplo, en un artículo de Wu y Brand, *Anal. Biochem.* 218:1-13, 1994.

Entre otros criterios para la selección de parejas particulares de grupo fluorescente-grupo desactivador se incluyen, por ejemplo, el rendimiento cuántico de emisión fluorescente por parte del grupo fluorescente; la longitud de onda de la fluorescencia emitida por el grupo fluorescente; el coeficiente de extinción del grupo desactivador; la longitud de onda de fluorescencia, en caso de existir, emitida por el grupo desactivador; y el rendimiento cuántico de la emisión fluorescente, en caso de existir, por parte del grupo desactivador. Además, en el caso de que el grupo desactivador también sea un grupo fluorescente, el grupo desactivador y el grupo fluorescente pueden seleccionarse de manera que la fluorescencia emitida por uno pueda distinguirse fácilmente de la fluorescencia emitida por el otro. Pueden encontrarse directrices adicionales sobre la selección de parejas particulares de grupo fluorescente-grupo desactivador en un artículo de revisión de Klostermeier y Millar, *Biopolymers* 61:159-179, 2002.

Entre las combinaciones ejemplares de grupos fluorescentes y grupos desactivadores que pueden utilizarse en el presente aspecto de la invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, grupo fluorescente rodamina 590 y grupo desactivador cristal violeta. Una combinación preferente de grupos fluorescente y desactivador es el grupo fluorescente 6-carboxifluoresceína y el grupo desactivador Cy5TM. Otros ejemplos de parejas de grupo fluorescente-grupo desactivador que pueden utilizarse en las sondas, métodos y kits de la invención pueden encontrarse en la patente US n° 6.245.514.

Entre los ejemplos de moléculas que pueden utilizarse tanto como grupo fluorescente como desactivador en FRET se incluyen fluoresceína, 6-carboxifluoresceína, 2',7'-dimetoxi-4',5'-dicloro-6-carboxifluoresceína, rodamina, 6-carboxirrodamina, 6-carboxi-X-rodamina y ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftalén-1-sulfónico (EDANS). La definición de si un grupo fluorescente es un donante o un aceptor se realiza a partir de sus espectros de excitación y de emisión, y el grupo fluorescente con el que se encuentra apareado. Por ejemplo, FAM TM resulta excitado más eficientemente por luz de una longitud de onda de 488 nm, y emite luz que presenta un espectro de 500 a 650 nm, y un máximo de emisión de 525 nm. Por consiguiente, FAM TM es un grupo fluorescente adecuado para la utilización con, por ejemplo, TAMRA como grupo desactivador, el cual presenta su máximo de excitación en 514 nm.

2. Ensayos basados en la hibridación

Los métodos para detectar y/o cuantificar el nivel de polinucleótidos de SENP1 o de telomerasa (ARN o ADNc construido a partir del mismo) utilizando técnicas de hibridación de ácidos nucleicos son conocidos del experto en la materia (ver Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2a edición, vols. 1 a 3, Cold Spring Harbor Press, New York, 1989). Las muestras biológicas pueden cribarse utilizando una sonda específica de SENP1 o de telomerasa. Dichas sondas corresponden en secuencia a una región del ARN de SENP1 o de la telomerasa, o al complemento de la misma. Bajo condiciones definidas, la hibridación específica de dicha sonda con un ácido nucleico de ensayo es indicativa de la presencia del polinucleótido de SENP1 o de telomerasa en una muestra. Las condiciones definidas resultarán suficientes para permitir la hibridación de la sonda con su diana sin hibridarse significativamente a otros polinucleótidos en una mezcla compleja (por ejemplo ADN genómico de una célula). Si se desea, puede utilizarse más de una sonda en la muestra de ensayo. La sonda puede comprender tan sólo 8, 15, 20, 50 ó 100, u otro número, de nucleótidos de la secuencia de ARN de SENP1 o de telomerasa, o el complemento de la misma, o puede comprender hasta 500, 1 kb o la secuencia de ARN completa o su complemento. En algunas realizaciones, la sonda presenta una longitud de entre 12 y 100 nucleótidos, o de entre 16 y 50 nucleótidos o de entre 18 y 40 nucleótidos.

Un método para evaluar la presencia, ausencia y/o cantidad de polinucleótidos de SENP1 o de telomerasa implica una transferencia northern: se aísla un ARNm a partir de una muestra biológica dada, se separa mediante electroforesis y se transfiere del gel a un soporte sólido (por ejemplo una membrana de nitrocelulosa). A continuación, las sondas de SENP o de telomerasa marcadas se hibridan con la membrana con el fin de identificar y/o cuantificar el ARNm. La expresión de polinucleótidos de SENP1 o de telomerasa también puede analizarse mediante otras técnicas conocidas de la técnica, por ejemplo transferencia de puntos, hibridación *in situ*, protección frente a la ARNasa, microchips de sondeo de ADN, y similares.

Un método alternativo que resulta bastante útil en el caso de que deba utilizarse un gran número de sondas diferentes es un formato de transferencia por puntos “inverso”, en el que la secuencia amplificada contiene un marcaje, y la sonda se encuentra unida al soporte sólido. Este formato resultaría útil en el caso de que los métodos de ensayo de la presente invención se utilizasen como uno de entre una batería de métodos realizados simultáneamente en una muestra. En este formato, las sondas no marcadas se unen a la membrana y se exponen a la muestra marcada bajo condiciones astringentes de hibridación apropiadas. La muestra marcada y no hibridada seguidamente se elimina mediante lavado bajo condiciones convenientemente astringentes, y después se analiza el filtro para la presencia de secuencias unidas.

Puede llevarse a cabo tanto el ensayo de transferencia por puntos directo como inverso convenientemente en una placa de microtitulación (ver la solicitud de patente US nº 07/695.072 y patente US nº 5.232.829). Las sondas pueden unirse a albúmina de suero bovino (BSA), por ejemplo, que se adhiere a la placa de microtitulación, inmovilizando de esta manera la sonda. Otro ejemplo de un método de utilización de una sonda de la invención para detectar un polinucleótido de SENP1 o de telomerasa se describe en la patente US nº 6.383.756, que proporciona un método para detectar un ácido nucleico unido a una membrana.

En otro ejemplo, puede detectarse un polinucleótido de SENP1 o de telomerasa utilizando métodos basados en ADN ramificado. En estos métodos, se construye un monómero dendrítico de dos cadenas de ADN que comparten una región de complementariedad de secuencia situada en la parte central de cada cadena. Al hibridarse las dos cadenas para formar el monómero, la estructura resultante presenta una parte central de doble cadena circundada por cuatro extremos de una sola cadena. Puede ensamblarse un dendrítico a partir de monómeros mediante hibridación de los extremos de una cadena de los monómeros entre sí, dejando todavía muchos extremos de una sola cadena libres. Estos extremos de una cadena libres pueden presentar las secuencias de cualquiera de los cebadores o sondas de la invención. Un dendrítico puede marcarse detectablemente con cualquier grupo detectable conocido por el experto en la materia, aunque sin limitación, tal como se ha indicado anteriormente en referencia a las sondas de la invención.

A continuación, pueden utilizarse dendríticos como sonda en, por ejemplo, los ensayos de “transferencia por puntos” indicados posteriormente. Además, puede utilizarse un dendrítico como sonda en cualquier método conocido por el experto en la materia en el que la sonda se detecta directamente. Una sonda se detecta directamente en el caso de que la presencia de la sonda pueda determinarse sin ninguna reacción o modificación posterior, tal como una transferencia por puntos o transferencia southern. Pueden encontrarse directrices adicionales sobre la selección y la utilización de dendríticos como sondas en la patente US nº 6.261.779 y en Nilsen *et al.*, J. Theoretical Biology 187:273-284, 1997; Capaldi *et al.*, Nucleic Acids Res. 28:21e, 2000; Wang *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 120:8281-8282, 1998; y Wang *et al.*, Electroanalysis 10:553-556, 1998.

B. Detección de ADN de SENP1

En algunos casos, resulta ventajoso detectar y analizar ADN genómico codificante de SENP1. Por ejemplo, puede resultar útil determinar la estructura y/o la secuencia de nucleótidos de una secuencia genómica codificante de SENP1 o que comprende secuencias reguladoras de SENP1 para identificar mutaciones asociadas con cáncer u otras enfermedades. De manera similar, pueden analizarse secuencias de ADNc de SENP1 y/o secuenciarse los nucleótidos.

En algunos casos, las secuencias genómicas de SENP1 se analizan para identificar polimorfismos (por ejemplo variantes) entre alelos comunes y alelos asociados a cáncer. Entre los tipos de análisis moleculares se incluye, aunque sin limitarse a ellos, análisis RFLP, análisis basado en PCR, análisis de SNP, etc.

C. Detección y cuantificación de polipéptidos SENP1 o telomerasa

Además de la detección de polinucleótidos de SENP1 o de telomerasa, también pueden utilizarse ensayos de afinidad, tales como inmunoensayos, para detectar polipéptidos SENP1 o telomerasa. Los inmunoensayos típicamente se utilizan para cuantificar los polipéptidos SENP1 o telomerasa en una muestra. Puede encontrarse una visión general de la tecnología aplicable en Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, 1988.

Los métodos de producción de anticuerpos policlonales y monoclonales que reaccionan específicamente con polipéptidos SENP1 o telomerasa son conocidos por el experto en la materia (ver, por ejemplo, Coligan, Current Protocols in Immunology, 1991; Harlow y Lane, *supra*; Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (2a edición, 1986); y Kohler y Milstein, Nature 256:495-497, 1975). Entre dichas técnicas se incluyen la preparación de anticuerpos mediante selección de anticuerpos de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en vectores fágicos o similares, así como la preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales mediante la inmunización de conejos o ratones (ver, por ejemplo, Huse *et al.*, Science 246:1275-1281, 1989; Ward *et al.*, Nature 341:544-546, 1989).

Pueden utilizarse polipéptidos SENP1 y/o telomerasa para producir anticuerpos reactivos específicamente con SENP1 o con telomerasa, respectivamente. Por ejemplo, se aísla y se purifica un SENP1 recombinante o un fragmento antigénico del mismo, por ejemplo tras la expresión recombinante en células eucarióticas o procarióticas. A continuación, el producto se inyecta en un animal capaz de producir anticuerpos. Pueden generarse anticuerpos monoclonales o policlonales, para la utilización posterior en inmunoensayos para medir la proteína.

Puede recogerse anticuerpos monoclonales y sueros policlonales y titularse frente a la proteína inmunogénica en un inmunoensayo, por ejemplo un inmunoensayo de fase sólida con el inmunógeno inmovilizado sobre un soporte sólido. Típicamente se seleccionan antisueros policlonales con un título de 10^4 o superior y se someten a reacción para su reactividad cruzada contra proteínas no SENP1 o telomerasa utilizando un inmunoensayo de unión competitiva. Los anticuerpos monoclonales y antisueros policlonales específicos habitualmente se unen con una K_d de por lo menos aproximadamente 0,1 mM, más habitualmente de por lo menos aproximadamente 1 μ M, opcionalmente de por lo menos aproximadamente 0,1 μ M o mejor, y opcionalmente 0,01 μ M o mejor.

Tras disponer de los anticuerpos específicos de SENP1 y/o de telomerasa, pueden detectarse polipéptidos SENP1 o telomerasa mediante una diversidad de métodos de inmunoensayo. Para una revisión de los procedimientos inmunológicos y de inmunoensayo, ver Basic and Clinical Immunology (Stites y Terr, editores, 7a edición, 1991). Además, los inmunoensayos de la presente invención pueden llevarse a cabo en cualquiera de entre varias configuraciones, que se revisan extensivamente en Enzyme Immunoassay (Maggio, editor, 1980) y en Harlow y Lane, *supra*.

Pueden detectarse y/o cuantificarse polipéptidos SENP1 y/o telomerasa utilizando cualquiera de entre varios ensayos de unión inmunológico bien conocidos (ver, por ejemplo, las patentes US nº 4.366.241, nº 4.376.110, nº 4.517.288 y nº 4.837.168). Para una revisión de los inmunoensayos generales, ver Methods in Cell Biology: Antibodies in Cell Biology, volumen 37 (Asai, editor, 1993); Basic and Clinical Immunology (Stites y Terr, editores, 7a edición, 1991). Los ensayos de unión inmunológica (o inmunoensayos) típicamente utilizan un anticuerpo que se une específicamente a una proteína o antígeno de elección (en este caso los polipéptidos SENP1 o telomerasa o subsecuencia antigénica de los mismos). El anticuerpo (por ejemplo anti-SENP1 o anti-telomerasa) pueden producirse mediante cualquiera de entre varios medios bien conocidos por el experto en la materia y tal como se ha indicado anteriormente.

Los inmunoensayos con frecuencia también utilizan un agente de marcaje para unirse específicamente y marcar el complejo formado por anticuerpo y antígeno. El agente de marcaje mismo puede ser uno de los grupos que comprende el complejo de anticuerpo/antígeno. De esta manera, el agente de marcaje puede ser un polipéptido SENP1 o telomerasa marcado o un anticuerpo anti-SENP1 o anti-telomerasa marcado. Alternativamente, el agente de marcaje puede ser un tercer grupo, tal como un anticuerpo secundario, que se une específicamente al complejo de anticuerpo/SENP1 o de anticuerpo/telomerasa (un anticuerpo secundario que típicamente es específico de anticuerpos de la especie a partir de la que se derivó el primer anticuerpo). Otras proteínas capaces de unirse específicamente a las regiones constantes de inmunoglobulina, tales como la proteína A o la proteína G también pueden utilizarse como el agente de marcaje. Estas proteínas muestran una fuerte reactividad no inmunogénica con las regiones constantes de inmunoglobulina de una diversidad de especies (ver, por ejemplo, Kronval *et al.*, J. Immunol. 111:1401-1406, 1973; Akerstrom *et al.*, J. Immunol. 135:2589-2542, 1985). El agente de marcaje puede modificarse con un grupo detectable, tal como biotina, al que puede unirse específicamente otra molécula, tal como estreptavidina. Es bien conocida por el experto en la materia una diversidad de grupos detectables.

Durante los ensayos, pueden resultar necesarias etapas de incubación y/o de lavado tras cada combinación de reactivos. Las etapas de incubación pueden durar entre aproximadamente 5 segundos y varias horas, opcionalmente entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 24 horas. Sin embargo, el tiempo de incubación depende del formato de ensayo, antígeno, volumen de solución, concentraciones y similares. Habitualmente, los ensayos se llevan a cabo a temperatura ambiente, aunque pueden llevarse a cabo en un intervalo de temperaturas, tal como entre 10°C y 40°C.

Los inmunoensayos para detectar polipéptidos SENP1 o telomerasa en muestras puede ser competitiva o no competitiva. Los inmunoensayos no competitivos son ensayos en los que se mide directamente la cantidad de antígeno. En los ensayos "sándwich", por ejemplo, los anticuerpos anti-SENP1 o anti-telomerasa pueden unirse directamente a un sustrato sólido sobre el que se inmovilizan. Estos anticuerpos inmovilizados seguidamente capturan los polipéptidos SENP1 o telomerasa presentes en la muestra de ensayo. El polipéptido SENP1 o telomerasa inmovilizado de esta manera seguidamente se une a un agente de marcaje, tal como un segundo anticuerpo anti-SENP1 o anti-telomerasa que porta un marcaje. Alternativamente, el segundo anticuerpo puede no presentar un marcaje pero puede, a su vez, unirse a un tercer anticuerpo marcado específico de anticuerpos de la especie a partir de la que se derivó el segundo anticuerpo. El segundo o tercer anticuerpo típicamente se modifica con un grupo detectable, tal como biotina, a la que se une específicamente otra molécula, por ejemplo estreptavidina, para proporcionar un grupo detectable.

En los ensayos competitivos, se mide indirectamente la cantidad de polipéptido SENP1 o telomerasa presente en la muestra mediante la medición de la cantidad de un polipéptido conocido añadido (exógeno) SENP1 o telomerasa desplazado (competitivamente) de un anticuerpo anti-SENP1 o anti-telomerasa por el polipéptido SENP1 o telomerasa desconocido presente en una muestra. En un ensayo competitivo, se añade una cantidad conocida de polipéptido SENP1 o telomerasa a una muestra y seguidamente ésta se pone en contacto con un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido SENP1 o telomerasa. La cantidad de polipéptido SENP1 o telomerasa exógeno unido al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración de polipéptido SENP1 o telomerasa presente en la mues-

tra. En algunas realizaciones, el anticuerpo se inmoviliza sobre un sustrato sólido. La cantidad de polipéptido SENP1 o telomerasa unido al anticuerpo puede determinarse mediante la medición de la cantidad de polipéptido SENP1 o de telomerasa presente en un complejo SENP1/anticuerpo o telomerasa/anticuerpo, o alternativamente mediante la medición de la cantidad de proteína no acomplexada remanente.

También puede utilizarse el análisis de transferencia western (inmunotransferencia) para detectar y cuantificar la presencia de polipéptidos SENP1 o de telomerasa en la muestra. La técnica generalmente comprende separar proteínas de la muestra mediante electroforesis en gel basándose en el peso molecular, transfiriendo las proteínas separadas a un soporte sólido adecuado (tal como un filtro de nitrocelulosa, un filtro de nilón o un filtro de nilón derivatizado) e incubar la muestra con los anticuerpos que se unen específicamente a SENP1 o a telomerasa. Los anticuerpos anti-SENP1 o anti-telomerasa se unen específicamente a SENP1 o a telomerasa sobre el soporte sólido. Estos anticuerpos pueden marcarse directamente o, alternativamente, pueden detectarse posteriormente utilizando anticuerpo marcados (por ejemplo anticuerpos antirátón de oveja marcados) que se unen específicamente a los anticuerpos anti-SENP1 o anti-telomerasa.

El experto en la materia apreciará que con frecuencia resulta deseable minimizar la unión no específica en inmunoensayos. Particularmente en el caso de que el ensayo implique un antígeno o anticuerpo inmovilizado sobre un sustrato sólido resulta deseable minimizar la cantidad de unión no específica al sustrato. Los medios para reducir dicha unión no específica son bien conocidos por el experto en la materia. Típicamente esta técnica implica recubrir el sustrato con una composición proteica. En particular, se utilizan ampliamente las composiciones de proteínas, tales como la albúmina de suero bovino (BSA), la leche desnatada en polvo y la gelatina.

El marcaje o grupo detectable particular utilizado en el ensayo no es un aspecto crítico de la invención, con la condición de que no interfiera significativamente con la unión específica del anticuerpo utilizado en el ensayo. El grupo detectable puede ser cualquier material que presente una propiedad física o química detectable. Este tipo de marcajes detectables han sido bien desarrollados en el campo de los inmunoensayos y, en general, puede aplicarse en la presente invención la mayoría de marcajes útiles en dichos métodos. De esta manera, un marcaje es cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Entre los marcajes útiles en la presente invención se incluyen perlas magnéticas, pigmentos fluorescentes, marcajes radioactivos, enzimas y marcajes colorimétricos, tales como el oro coloidal, el vidrio coloreado o las perlas plásticas.

D. Detección y cuantificación de SENP1 o de la actividad de telomerasa

La cantidad de SENP1 o de telomerasa también puede determinarse mediante la detección de la actividad de las proteínas.

SENP1 es una proteasa que elimina las sentrininas de las proteínas (ver, por ejemplo, la patente US nº 6.596.527; Gong *et al.*, J. Biol. Chem. 275:3355-3359, 2000, y Bailey *et al.*, J. Biol. Chem. 279:692-703, 2004). Por ejemplo, la actividad de SENP1 puede detectarse mediante la detección de la eliminación de las sentrininas de una cantidad conocida de proteína sentrinizada en la muestra.

La actividad de telomerasa puede medirse mediante cualquier ensayo de entre los ensayos conocidos de la técnica (ver, por ejemplo, Hiyama *et al.*, Cancer Lett. 194:221-233, 2003). Por ejemplo, puede utilizarse TRAP (protocolo de amplificación por repetición telomérica) para detectar la actividad de telomerasa con una elevada sensibilidad mediante la utilización de PCR (ver Kim N.W. *et al.*, Science 206:2011-2015, 1994; Piatyszek M.A. *et al.*, Meth. Cell Sci. 17:1-15, 1995; Woodring *et al.*, Nuc. Acids Res. 23:3794-3795, 1995; patentes US nº 6.551.774, nº 6.391.554 y nº 5.837.453). Este método implica la detección de telomerasa mediante un sistema de ensayo de extensión de un único cebador y se divide en líneas generales en tres etapas. En primer lugar se extrae telomerasa de las células. A continuación, se lleva a cabo una reacción de extensión de una cadena TTAGGG mediante la telomerasa y los productos de reacción se amplifican mediante PCR utilizando dos cebadores. Finalmente, los productos amplificados se someten a electroforesis para detectar la actividad de telomerasa mediante confirmación de escaleras en una autorradiografía.

Una variación de TRAP implica verde SYBR en tiempo real para cuantificar la actividad de telomerasa (ver, por ejemplo, Wege *et al.*, Nuc. Acids Res. 31:e3, 2003).

Otra variación de TRAP se denomina PCR por extensión telomérica (PTEP) (ver, por ejemplo, Chen *et al.*, Bio-techniques 35:158-162, 2003). De manera similar a TRAP, este método se basa en la amplificación por PCR tras la reacción *in vitro* de la telomerasa, mientras que la reacción *in vitro* de la telomerasa en el presente caso se termina prematuramente, y no aleatoriamente. Aparte de lo anterior, los productos de extensión telomérica se utilizan como cebadores iniciales, en lugar de como moldes, para inducir la amplificación con un plásmido de ADN especialmente construido como molde que no puede amplificarse directamente con el cebador de telomerasa. Este producto final es un fragmento específico de ADN que refleja la actividad de la telomerasa. El experto en la materia reconocerá que también pueden utilizarse otros métodos para detectar la actividad de telomerasa (ver, por ejemplo, la publicación de patente US nº 2002/0025518).

III. Estándares de cuantificación para ensayos de las invenciones

En muchas realizaciones de la invención, la cantidad de SENP1 o de telomerasa en una muestra biológica se compara con uno o más valores estándares. En general, el valor estándar representa la cantidad de SENP1 o de telomerasa encontrada en muestras biológicas procedentes de un individuo sano (por ejemplo no diagnosticado de cáncer y/o que no contiene un número significativo de células de cáncer). Resultarán apropiados diferentes valores estándares dependiendo de varios factores. Por ejemplo, la cantidad de SENP1 o de telomerasa en una muestra procedente de un individuo sano puede variar dependiendo del método utilizado para cuantificar SENP1 o telomerasa. Además, el valor estándar puede variar dependiendo de la proporción de falsos positivos y de falsos negativos proporcionados en un ensayo diagnóstico. Por ejemplo, en el caso de que el valor estándar se fije en un valor bajo, el número de falsos negativos se reducirá, pero la proporción de falsos positivos (aquellos sin cáncer que se puntúan como presentando células de cáncer) se incrementará. De esta manera, un usuario puede comparar la cantidad de SENP1 o de telomerasa en una muestra con diferentes valores estándares dependiendo de la tolerancia para resultados falsos negativos o falsos positivos.

En algunos casos, el valor estándar se determinará basándose en la media, la mediana u otro cálculo estadístico basado en una pluralidad de muestras que es conocido que no presentan células de cáncer o que es conocido que presentan células de cáncer. El valor estándar no es necesario que sea recalculado para cada ensayo, sino que puede ser un único valor o un intervalo predeterminado. El valor estándar puede almacenarse en una memoria de ordenador y accederse según resulte necesario. En otras realizaciones, el valor estándar se determina para cada muestra biológica cada vez que se procesa un conjunto de muestras biológicas. En estos casos, el valor estándar es la cantidad de SENP1 o de telomerasa en una muestra que es conocido, o de la que por lo menos se sospecha, que contiene células de cáncer. En algunas realizaciones, estas muestras estándares se recogen del mismo individuo y se someten a ensayo para cáncer. Por ejemplo, pueden obtenerse un tumor sólido y una muestra que no contenga cáncer del mismo individuo y la cantidad de SENP1 y/o de telomerasa en la muestra que no contiene cáncer puede formar la base del valor estándar. En otras realizaciones, las muestras estándares se obtienen de otro individuo o individuos.

En algunos casos, las cantidades de SENP1 o de telomerasa (tanto de la muestra biológica de interés como del estándar de no cáncer) se normalizan respecto a un segundo valor. La normalización resulta útil, por ejemplo, para eliminar o minimizar errores introducidos por un usuario o por ensayos en las cantidades detectadas o para minimizar errores causados por números variables de células en una muestra. La normalización típicamente se basa en un valor que incorpora algunos de los mismos errores. Por ejemplo, la cantidad de un segundo transcrito en la misma muestra biológica puede utilizarse para normalizar los valores de SENP1 o de telomerasa. Típicamente se conoce o se sospecha que el segundo transcrito se encuentra afectado por la presencia o ausencia de células de cáncer en la muestra. Entre los "transcritos normalizadores" ejemplares (también conocidos como transcritos de "genes de mantenimiento") se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, las proteínas humanas siguientes: proteína fosfatasa 1, subunidad catalítica, isoforma alfa (PPP1CA), proteína de unión a caja TATA (por ejemplo M55654), HPRT1 (por ejemplo M26434), β -glucuronidasa, β 2-microglobulina, fosfoglicerol quinasa 1 (por ejemplo NM_000291), β -actina (por ejemplo NM_001141), receptor de transferrina (por ejemplo NM_003234), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (por ejemplo NM_002046), albúmina de suero humano (por ejemplo NM_000477), tubulina, hipoxantina fosforibosiltransferasa (por ejemplo NM_000194), proteína ribosómica mitocondrial L32 (por ejemplo NM_031903), ARN 28S, ARN 18S, 5-aminolevulinato sintasa, y porfobilinógeno desaminasa (ver también el kit de selección de gen de mantenimiento h LightCycler, Roche Applied Sciences, n° de catálogo 3310159; Thellin O. *et al.*, J. Biotechnol. 75:291, 1999; Warrington J.A. *et al.*, Physiol. Genomics 2:143, 2000). El experto en la materia reconocerá que muchos genes de mantenimiento, entre otros, proporcionarán valores normalizadores equivalentes. Los valores pueden normalizarse según cualquiera de los métodos estadísticos generalmente conocidos, incluyendo la simple división de los valores por la cantidad de transcrito o de proteína normalizadora.

IV. Registro de un diagnóstico, pronóstico o estadio de cáncer

Los métodos de la invención pueden implicar registrar la cantidad de SENP1 y/o de telomerasa en una muestra y/o un diagnóstico, pronóstico o estadio de cáncer, incluyendo, por ejemplo, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de páncreas y cáncer de intestino delgado.

Dicha información puede registrarse en forma de texto o datos y puede almacenarse en una forma legible por ordenador. Este sistema informático típicamente comprende subsistemas principales, tales como un procesador central, una memoria de sistema (típicamente RAM), un controlador de entrada/salida (I/O), un dispositivo externo, tal como una pantalla de visualización mediante un adaptador de pantalla, puertos en serie, un teclado, una unidad fija de disco mediante un interfaz de almacenamiento y un dispositivo de lectura de disquete para recibir un disquete, y un dispositivo CD-ROM (o DVD-ROM) operativo para recibir un CD-ROM. Pueden conectarse muchos otros dispositivos, tales como un interfaz de red conectado mediante un puerto en serie.

El sistema informático también puede conectarse a una red, comprendiendo una pluralidad de dispositivos informáticos conectados mediante un enlace de datos, tal como un cable Ethernet (coaxial o 10BaseT), una línea telefónica, línea ISDN, red inalámbrica, fibra óptica u otro medio de transmisión de señales adecuado, en el que por lo menos un dispositivo de red (por ejemplo un ordenador, matriz de discos, etc.) comprende un patrón de dominios magnéticos (por ejemplo un disco magnético) y/o dominios de carga (por ejemplo una matriz de celdas DRAM) que componen un patrón de bits codificante de datos captados de un ensayo de la invención.

El sistema informático puede comprender código para interpretar los resultados de cuantificación de SENP1 o de telomerasa en una muestra biológica. De esta manera, en una realización ejemplar, los resultados de genotipo se proporcionan a un ordenador en el que un procesador central ejecuta un programa informático para determinar un diagnóstico, pronóstico o determinado de estadio de un cáncer particular, por ejemplo seleccionado de entre cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de páncreas y cáncer de intestino delgado.

V. Diagnóstico de cáncer

Los presentes métodos pueden utilizarse en el diagnóstico, pronóstico, clasificación y tratamiento de varios tipos de cáncer. Puede detectarse un cáncer en cualquier estado de progresión, tal como cáncer primario, metastásico y recurrente. La información referente a numerosos tipos de cáncer puede obtenerse, por ejemplo, de la American Cancer Society (www.cancer.org) o de, por ejemplo, Wilson *et al.*, Harrison's Principles of Internal Medicine, 12a edición, McGraw-Hill Inc., 1991.

La presente invención proporciona métodos para determinar si un mamífero (por ejemplo un ser humano) presente cáncer de vejiga, si una muestra biológica contiene células de vejiga cancerosas o no, para estimar la probabilidad de que un mamífero desarrolle cáncer de vejiga, y para realizar un seguimiento de la eficacia del tratamiento anticáncer en un mamífero que presenta cáncer de vejiga. Dichos métodos se basan en el descubrimiento de que las células de cáncer presentan un nivel elevado de polinucleótido y/o polipéptido SENP1. Por consiguiente, mediante la determinación de si una célula contiene niveles elevados de SENP1 o TERT o TERC resulta posible determinar si la célula de vejiga es cancerosa. Además, la presencia de células cancerosas de vejiga puede determinarse indirectamente, por ejemplo en determinadas realizaciones, una muestra biológica que no contiene ella misma células de vejiga cancerosas, pero que se ha obtenido de un animal que presenta células cancerosas en otras partes de su cuerpo, puede contener niveles elevados de SENP1 o TERT o TERC, reflejando la presencia de las células cancerosas.

En numerosas realizaciones de la presente invención, el nivel y/o presencia de SENP1 o TERT o TERC se detecta en una muestra biológica, detectando de esta manera la presencia o ausencia de células de vejiga cancerosas en la muestra biológica o, en determinadas realizaciones, en el mamífero a partir del que se extrajo la muestra biológica. En algunas realizaciones, la muestra biológica comprende una muestra de tejido procedente de un tejido que se sospecha que contiene células de vejiga cancerosas. Por ejemplo, en un individuo que se sospecha que presenta cáncer de vejiga, se biopsia tejido de vejiga o se obtiene orina. En otras realizaciones, se determina la cantidad de SENP1 o TERT o TERC en un líquido corporal (por ejemplo sedimento urinario; ver, por ejemplo, Melissourgos *et al.*, Urology 62:362-367, 2003), saliva, sangre, semen, etc.). En otras realizaciones, se analiza una muestra de tejido que es conocido que contiene células de vejiga cancerosas, por ejemplo procedentes de un tumor, para medir los niveles de SENP1 o TERT o TERC para determinar información sobre el cáncer de vejiga, por ejemplo la eficacia de determinados tratamientos, la esperanza de supervivencia del animal, etc. Con frecuencia, los métodos se utilizan conjuntamente con métodos diagnósticos adicionales, por ejemplo la detección de otros marcadores de cáncer de vejiga, etc.

Además, los presentes métodos pueden utilizarse para evaluar la eficacia de un curso de tratamiento. Por ejemplo, en un mamífero con cáncer de vejiga del que se ha encontrado que una muestra biológica contiene una cantidad elevada de SENP1 o TERT o TERC, puede evaluarse la eficacia de un tratamiento anticáncer mediante el seguimiento de los niveles de SENP1 o TERT o TERC durante un periodo de tiempo. Por ejemplo, una reducción de los niveles de SENP1 o TERT o TERC en una muestra biológica obtenida de un mamífero tras un tratamiento en comparación con un nivel en una muestra obtenida del mamífero antes del tratamiento, o anteriormente durante el mismo, indica un tratamiento eficaz.

Los métodos para detectar cáncer de vejiga pueden comprender la detección de una o más secuencias de polinucleótido o de polipéptido asociadas al cáncer. Por consiguiente, puede utilizarse SENP1 o TERT o TERC solos, conjuntamente o en combinación con otros marcadores para el diagnóstico o pronóstico del cáncer de vejiga.

Los métodos de la presente invención pueden utilizarse para determinar el curso óptimo de tratamiento en un mamífero que presenta cáncer de vejiga. Por ejemplo, la presencia de un nivel elevado de SENP1 o TERT o TERC puede indicar una esperanza de supervivencia reducida de un mamífero que presenta cáncer de vejiga, indicando de esta manera un tratamiento más agresivo para el mamífero. Además, puede establecerse fácilmente una correlación entre los niveles de SENP1 o TERT o TERC o la presencia o ausencia de una presencia diagnóstica de SENP1 o TERT o TERC (es decir, una cantidad de SENP1 o TERT o TERC superior al valor estándar) y la eficacia relativa de uno u otro agente anticáncer. Estos análisis pueden llevarse a cabo, por ejemplo, retrospectivamente, es decir, mediante la detección de los niveles de SENP1 o TERT o TERC en muestras obtenidas anteriormente de mamíferos que posteriormente se han sometido a uno o más tipos de terapia anticáncer, y correlacionar los niveles de SENP1 o TERT o TERC con la eficacia conocida del tratamiento.

Al realizar un diagnóstico, pronóstico o evaluación de riesgo o clasificación basada en la expresión de SENP1 y TERT o TERC, la cantidad de expresión de SENP1 y/o TERT o TERC puede compararse con un valor estándar, tal como se ha comentado anteriormente. En algunos casos, puede realizarse un diagnóstico o pronóstico del cáncer de vejiga en el caso de que la expresión de SENP1 y TERT o TERC en la muestra biológica sea más alta que el valor estándar. En algunos casos, la cantidad de expresión de SENP1 y/o de telomerasa en la muestra biológica es por lo

menos 10% más, 25% más, 50% más, 75% más, 90% más, 2 veces más, 3 veces más, 5 veces más, 10 veces más, 50 veces más o más de 100 veces más que el valor estándar (o de un valor que represente la expresión de SENP1 y TERT o TERC en una muestra que no contiene cáncer).

VI. Preparación de muestras y amplificación de ácidos nucleicos

Las muestras generalmente se derivan o se aíslan a partir de sujetos, típicamente sujetos mamíferos, más típicamente sujetos humanos. Opcionalmente se utiliza esencialmente cualquier técnica para obtener estas muestras, incluyendo, por ejemplo, biopsia, raspado, venipunción, exudados u otras técnicas conocidas de la técnica.

Los métodos para almacenar especímenes, cultivar células, aislar y preparar ácidos nucleicos a partir de estas fuentes son generalmente conocidos de la técnica y muchos de ellos se describen adicionalmente en las referencias y/o ejemplos proporcionados en la presente memoria.

A título de ilustración adicional, antes de analizar los ácidos nucleicos diana indicados en la presente memoria, dichos ácidos nucleicos pueden purificarse o aislarse a partir de muestras que típicamente incluyen mezclas complejas de diferentes componentes. Las células en las muestras recogidas típicamente se lisan para liberar el contenido celular. Por ejemplo, las células en el sedimento urinario pueden lisarse mediante su puesta en contacto con diversos enzimas o compuestos químicos, y/o lisarse mediante otros enfoques conocidos de la técnica. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos se analizan directamente en el lisado celular. En otras realizaciones, los ácidos nucleicos se purifican o extraer adicionalmente a partir de los lisados celulares antes de la detección. Puede utilizarse esencialmente cualquier método de extracción de ácidos nucleicos para purificar los ácidos nucleicos en las muestras utilizadas en los métodos de la presente invención. Entre las técnicas ejemplares que pueden utilizarse para purificar ácidos nucleicos se incluyen, por ejemplo, la cromatografía de afinidad, la hibridación a sondas inmovilizadas sobre soporte sólidos, la extracción líquido-líquido (por ejemplo la extracción fenol-cloroformo, etc.), la precipitación (por ejemplo utilizando etanol, etc.), la extracción con papel de filtro, la extracción con reactivos formadores de micelas (por ejemplo cetil-trimetilamonio-bromuro, etc.), la unión a pigmentos intercalantes inmovilizados (por ejemplo bromuro de etidio, acridina, etc.), la adsorción a gel de sílice o a tierras diatomáceas, la adsorción a partículas de vidrio magnéticas o a partículas de organosilano bajo condiciones caotrópicas, y/o similares. El procesamiento de muestras también se describe en, por ejemplo, las patentes US nº 5.155.018, nº 6.383.393 y nº 5.234.809.

A título de ejemplo adicional, los ácidos nucleicos no modificados pueden unirse a un material con una superficie de sílice. Muchos de los procedimientos que se adaptan opcionalmente para la utilización en la puesta en práctica de los métodos de la presente invención se encuentran descritos en la técnica. A título ilustrativo, Vogelstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:615-619, 1979, describe la purificación de ácidos nucleicos a partir de geles de agarosa en presencia de yoduro sódico utilizando vidrio al plomo molido. Marko *et al.*, Anal. Biochem. 121:382-387, 1982, describen la purificación de ácidos nucleicos a partir de bacterias sobre polvo de vidrio en presencia de perclorato sódico. En el documento DE nº A-3734442, se aíslan ácidos nucleicos sobre filtros de fibra de vidrio. Los ácidos nucleicos unidos a estos filtros de fibra de vidrio se lavan y después se eluyen con un tampón Tris/EDTA que contiene metanol. Se describe un procedimiento similar en Jakobi *et al.*, Anal. Biochem. 175:196-201, 1988. En particular, Jakobi *et al.* describen la unión selectiva de ácidos nucleicos a superficies de vidrio en soluciones salinas caotrópicas y la separación de ácidos nucleicos de contaminantes, tales como agarosa, proteínas y residuos celulares. Para separar las partículas de vidrio de los contaminantes, las partículas pueden centrifugarse o pueden pasarse líquidos a través de los filtros de fibra de vidrio. Además, la utilización de partículas magnéticas para inmovilizar los ácidos nucleicos tras la precipitación mediante la adición de sal y etanol se describe en, por ejemplo, Alderton *et al.*, Anal. Biochem. 201:166-169, 1992, y en la patente PCT nº GB91/00212. En este procedimiento, los ácidos nucleicos se aglutinan conjuntamente con las partículas magnéticas. El aglutinado se separa del solvente original mediante la aplicación de un campo magnético y realizando una o más etapas de lavado. Tras por lo menos una etapa de lavado, los ácidos nucleicos típicamente se disuelven en un tampón Tris.

Las partículas magnéticas en una matriz de vidrio poroso que se cubre con una capa que incluye, por ejemplo, estreptavidina también puede utilizarse en determinadas realizaciones de la invención. Estas partículas pueden utilizarse, por ejemplo, para aislar ácidos nucleicos y proteínas conjugadas con biotina. También se utilizan opcionalmente partículas ferromagnéticas, ferromagnéticas y superparamagnéticas. Las partículas de vidrio magnéticas y métodos relacionados que pueden adaptarse para la utilización en la puesta en práctica de los métodos descritos en la presente memoria también se describen en, por ejemplo, la patente WO nº 01/37291.

VIa. Realizaciones preferentes de la invención

Las realizaciones particularmente preferentes de la invención se describen a continuación. Una realización preferente de la invención es un método para detectar la expresión de SENP1 en una muestra biológica, comprendiendo el método las etapas de determinar la cantidad de SENP1 en una muestra biológica procedente de un individuo que presenta o que se sospecha que presenta un cáncer seleccionado de entre el grupo que consiste de cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de páncreas y cáncer de intestino delgado.

En una realización preferente, la cantidad de SENP1 se determina mediante la detección de un polinucleótido codificante de SENP1 en la muestra. Por lo tanto, preferentemente la etapa de determinar la cantidad de SENP1

comprende la etapa de detectar un polinucleótido codificante de SENP1 en la muestra. Esta etapa de detección puede comprender amplificar el polinucleótido en una reacción de amplificación.

Preferentemente, el método comprende además la etapa de comparar la cantidad de SENP1 y de telomerasa en la muestra con un estándar de SENP1 y con un estándar de telomerasa, respectivamente, en donde el estándar de SENP1 representa SENP1 en células normales y el estándar de telomerasa representa las cantidades de telomerasa en células normales.

En resumen, en una realización preferente de la invención, se proporciona un método para detectar la expresión de SENP1 en una muestra biológica procedente de un individuo que presenta o que se sospecha que presenta un cáncer de vejiga, comprendiendo el método la determinación de la cantidad de SENP1 o de TERT o TERC en la muestra biológica mediante:

a) la amplificación de un polinucleótido codificante de SENP1 en la muestra biológica en una reacción de amplificación, y

b) detectar la cantidad del producto de amplificación de la etapa a) para detectar la expresión de SENP1 en la muestra biológica,

c) determinar la cantidad de TERC o TERT en la muestra biológica.

Preferentemente, la reacción de amplificación comprende por lo menos dos oligonucleótidos diferentes, comprendiendo una secuencia por lo menos 90% idéntica a por lo menos 10 nucleótidos contiguos de secuencia SEC ID nº 1, o un complemento de la misma, de manera que, durante la reacción de amplificación, los oligonucleótidos ceban la amplificación de por lo menos un fragmento de secuencia SEC ID nº 1.

Preferentemente, el producto de amplificación (la cantidad del mismo) de la reacción de amplificación se detecta en una etapa que comprende hibridar un oligonucleótido detectablemente marcado con el producto. Preferentemente, la reacción de amplificación comprende además una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que presenta actividad 5' a 3' exonucleasa bajo condiciones que permiten que la polimerasa fragmente el oligonucleótido detectablemente marcado. Preferentemente, el método comprende además la etapa de comparar la cantidad de SENP1 y de telomerasa en la muestra con un estándar de SENP1 y con un estándar de telomerasa, respectivamente, en donde el estándar de SENP1 representa SENP1 en células de vejiga normales y el estándar de telomerasa representa las cantidades de telomerasa en células de vejiga normales. El estándar es preferentemente una muestra biológica (que comprende células) procedente de un individuo de control que no sufre cáncer de vejiga.

El método opcionalmente puede comprender la etapa de obtener la muestra biológica del individuo antes de determinar la cantidad de SENP1 en la muestra biológica. Preferentemente, el método comprende además la etapa de registrar un diagnóstico de cáncer de vejiga.

En otra realización preferente de la invención, se proporciona un método para determinar si una muestra biológica de un paciente comprende células de cáncer de vejiga, comprendiendo las etapas siguientes:

a) determinar la cantidad de SENP1 en la muestra biológica,

b) determinar la cantidad de SENP1 en una muestra biológica de un individuo de control que no sufre cáncer de vejiga,

c) determinar la cantidad de TERT o TERC en la muestra biológica,

siendo una diferencia significativa entre la cantidad de SENP1 en la muestra biológica del paciente y la cantidad de SENP1 en la muestra biológica del individuo de control una indicación de que la muestra biológica comprende células de cáncer de vejiga.

Una diferencia significativa es preferentemente una diferencia de 1,5 veces o superior, más preferentemente una diferencia de dos veces o superior.

La etapa de determinar la cantidad de SENP1 en la muestra biológica preferentemente comprende las etapas siguientes:

a) amplificar un polinucleótido codificante de SENP1 en la muestra biológica en una reacción de amplificación, y

b) detectar la cantidad de producto de amplificación de la etapa a) para determinar la cantidad de SENP1 en la muestra biológica.

Preferentemente, la reacción de amplificación comprende por lo menos dos oligonucleótidos diferentes que comprenden una secuencia por lo menos 90% idéntica a por lo menos 10 nucleótidos contiguos de la secuencia SEC ID nº 1, o un complemento de la misma, de manera que, durante la reacción de amplificación, los oligonucleótidos ceban la amplificación de por lo menos un fragmento de secuencia SEC ID nº 1.

Preferentemente, el producto de amplificación (la cantidad del mismo) de la reacción de amplificación se detecta en una etapa que comprende hibridar un oligonucleótido detectablemente marcado con el producto. Preferentemente, la reacción de amplificación comprende además una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que presenta actividad 5' a 3' exonucleasa bajo condiciones que permiten que la polimerasa fragmente el oligonucleótido detectablemente marcado. Preferentemente, el método comprende además la etapa de comparar la cantidad de SENP1 y de telomerasa en la muestra con un estándar de SENP1 y con un estándar de TERT o TERC, respectivamente, en donde el estándar de SENP1 representa SENP1 en células de vejiga normales y el estándar de TERT o TERC representa las cantidades de TERT o TERC en células de vejiga normales.

El estándar preferentemente es una muestra biológica (que comprende células) de un individuo de control que no sufre cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de pulmón, cáncer de ovario o cáncer de páncreas.

El método opcionalmente puede comprender la etapa de obtención de la muestra biológica del individuo antes de determinar la cantidad de SENP1 en la muestra biológica. Preferentemente, el método comprende además la etapa de registrar un diagnóstico de un cáncer seleccionado de entre el grupo que consiste de cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de páncreas y cáncer de intestino delgado.

VII. Kits

La presente invención también proporciona kits para el diagnóstico de cáncer mediante la detección de SENP1 y de telomerasa (por ejemplo polinucleótidos, polipéptidos, o actividad). Los kits de la invención generalmente comprenden reactivos para detectar polipéptidos SENP1 y/o telomerasa y/o polinucleótidos de SENP1 y/o de telomerasa, y opcionalmente contienen instrucciones escritas para su utilización.

En algunas realizaciones, los kits de la invención comprenden reactivos para amplificar polinucleótidos de SENP1 y/o de telomerasa. Entre dichos reactivos pueden incluirse, por ejemplo, cebadores específicos de SENP1 y/o de telomerasa y/o sondas detectablemente marcadas (por ejemplo 5' exonucleasa, baliza molecular o sondas Scorpion). Los kits opcionalmente pueden incluir reactivos de amplificación, tales como polimerasas termoestables, transcriptasa inversa, nucleótidos, tampones y sales, u otros componentes, tal como se describe en la presente memoria o que son conocidos de la técnica.

En algunos casos los kits comprenden por lo menos un oligonucleótido que comprende una secuencia por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% idéntica a por lo menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 35, 50 ó más nucleótidos contiguos de secuencia SEC ID nº 1, o un complemento de la misma, de manera que, al someter el oligonucleótido y un polinucleótido que comprende la secuencia SEC ID nº 1 a una reacción de amplificación, el oligonucleótido ceba la amplificación de por lo menos un fragmento de secuencia SEC ID nº 1.

En algunos casos, los kits también comprenden el oligonucleótido detectablemente marcado que comprende una secuencia por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ó 95% idéntica a por lo menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 35, 50 ó más nucleótidos contiguos de secuencia SEC ID nº 1, o un complemento de la misma.

En algunos casos los kits comprenden por lo menos un oligonucleótido que comprende una secuencia por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ó 95% idéntica a por lo menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 35, 50 ó más nucleótidos contiguos de:

- i) la ARN de telomerasa humana (TERC),
- ii) el ARNm de la proteína transcriptasa inversa de la telomerasa humana (TERT),
- iii) un complemento de TERC, o
- iv) un complemento de TERT,

de manera que, al someter el oligonucleótido y el ARNm de TERC o de TERT, a una reacción de amplificación, el oligonucleótido ceba la amplificación de por lo menos un fragmento de ARNm de TERC o de TERT.

En algunos casos, los kits comprenden el oligonucleótido detectablemente marcado que comprende una secuencia por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ó 95% idéntica a por lo menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 35, 50 ó más nucleótidos contiguos de:

- i) ARN de telomerasa humana (TERC),
- ii) ARNm de proteína transcriptasa inversa de telomerasa humana (TERT),
- iii) un complemento de TERC, o
- iv) un complemento de TERT.

En otras realizaciones, los kits de la invención comprenden reactivos que se unen específicamente a polipéptidos SENP1 o telomerasa. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los kits de la invención comprenden un primer anticuerpo que se une específicamente a SENP1 o a telomerasa. Los kits también pueden comprender un segundo anticuerpo que se une al primer anticuerpo (es decir, de una especie diferente) y un marcaje detectable.

VIII. Cribado de antagonistas de SENP1

Pueden utilizarse varios protocolos de cribado diferentes para identificar agentes que modulan el nivel de actividad de SENP1 en las células, por ejemplo en células de mamífero, por ejemplo en células humanas. En términos generales, los métodos de cribado pueden implicar el cribado de una pluralidad de agentes para identificar un agente que interactúa con SENP1, por ejemplo uniéndose a SENP1 e impidiendo la actividad de SENP1 o impidiendo que un activador de SENP1 active SENP1.

1. Ensayos de unión de SENP1

Pueden llevarse a cabo cribados preliminares mediante cribado de agentes capaces de unirse a SENP1, debido a que por lo menos algunos de los agentes identificados de esta manera pueden ser antagonistas de SENP1. Los ensayos de unión habitualmente implican poner en contacto una proteína SENP1 con uno o más agentes de ensayo y dejar suficiente tiempo para que la proteína y los agentes de ensayo formen un complejo de unión. Puede detectarse cualquier complejo de unión formado utilizando cualquiera de entre varias técnicas analíticas establecidas. Entre los ensayos de unión de proteínas se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, los ensayos de unión inmunohistoquímica, la citometría de flujo u otros ensayos que mantienen la conformación de SENP1. La proteína SENP1 utilizada en dichos ensayos puede ser de expresión natural, clonada o sintética.

Los ensayos de unión también resultan útiles, por ejemplo, para identificar proteínas endógenas que interactúan con SENP1.

2. Células y reactivos

Los métodos de cribado de la invención pueden llevarse a cabo en forma de ensayos *in vitro* o basados en células. Los ensayos basados en células pueden llevarse a cabo en cualquier célula en la que se exprese un polipéptido SENP1 endógena o exógenamente. En algunas realizaciones, los ensayos basados en células pueden llevarse a cabo utilizando células que presentan una actividad o expresión de telomerasa reducida o indetectable y/o que presentan un fenotipo neoplásico. En algunas realizaciones, las líneas celulares inmortales negativas para expresión de TERT se someten a ensayo para su susceptibilidad a inhibidores potenciales de SENP1. Estas líneas celulares negativas para telomerasa se propone que resultan útiles en dicho cribado debido a que probablemente replican sus telómeros mediante un mecanismo independiente de telomerasa (alargamiento alternativo de telómeros, o "ALT"). Sin pretensión del imitar el alcance de la invención a un mecanismo de acción particular, los presentes inventores proponen que SENP1 se encuentra implicado en el mantenimiento de ALT. La inhibición de ALT por un inhibidor de SENP1 en este caso se predice que resultaría en una alteración de la estructura telomérica, inhibiéndose finalmente la división de estas células. Por el contrario, en los casos en los que la telomerasa se encuentra activa en las líneas celulares, la telomerasa continuaría permitiendo la división celular incluso en presencia de un inhibidor de SENP1.

Los ejemplos de células que no expresan telomerasa (células "ALT") son conocidos de la literatura (ver, por ejemplo, Tsutsui T. *et al.*, Carcinogenesis 24:953-965, 2003; Bryan T.M., Hum Mol. Genet. 6:921-926, 1997; Guilleret I. *et al.*, Carcinogenesis 23:2025-2030, 2002). Entre los ejemplos de líneas celulares ALT se incluyen, aunque sin limitación, las células SUSM-1, WI38 VA13/2RA, BET-3M, GM847, MeT-4A, IICF/c, IICF-T/A6, MDAH 087, Saos-2 y U-2.

La inhibición de ALT puede detectarse mediante ensayo de un cambio de la longitud de los telómeros (ver, por ejemplo, el ensayo de longitud de los telómeros TeloTAGGG, de Roche Applied Biosystems, o Tsutsui T. *et al.*, Carcinogenesis 24:953-965, 2003), o en un cambio de marcadores morfológicos tales como la presencia de cuerpos PML que presenta una forma de "rosquilla" en células ALT en lugar de la apariencia normal puntiforme de los PML-NB en las células que no experimentan ALT (ver, por ejemplo, Yeager T.R. *et al.*, Cancer Res. 59:4175-4179, 1999, la inhibición de la división celular (determinada mediante, por ejemplo, el recuento del número de células en diferentes puntos del tiempo (por ejemplo utilizando productos Guava Technology™), la utilización de ensayos basados en agar blando para realizar un recuento del número de colonias en diferentes puntos del tiempo, la utilización de tecnología de estadificación para determinar el estadio del ciclo celular en el que se encuentran las células, el análisis visual de las células mediante microscopía, los análisis cromosómicos o la tecnología Cellomics™ o el análisis de la expresión de las proteínas, por ejemplo mediante transferencia western o análisis inmunohistoquímicos).

Los ensayos basados en células pueden implicar células completas o fracciones celulares que contengan SENP1 para cribar para un agente de unión o de modulación de la actividad de SENP1 por parte del agente. Las células utilizadas en los ensayos basados en células pueden ser células primarias o células tumorales, u otros tipos de líneas celulares inmortales. Evidentemente SENP1 puede expresarse en células que no expresan endógenamente SENP1.

3. Señalización de la actividad o sucesos posteriores

También puede realizarse un seguimiento de la actividad de señalización o de otros sucesos posteriores regulados por SENP1 para identificar los antagonistas de SENP1. De esta manera, en algunas realizaciones, se pone en contacto una pluralidad de agentes con una célula que expresa SENP1 y las células seguidamente se criban para un cambio de señalización o de un suceso posterior. La agrupación de agentes que modulan un suceso posterior regulado por SENP1 típicamente se encuentra enriquecida en antagonistas de SENP1 debido a que por lo menos algunos de los agentes identificados probablemente son antagonistas directos de SENP1. Entre los sucesos posteriores se incluyen aquellas actividades o manifestaciones que se producen como resultado de la inhibición de SENP1, y pueden incluir, por ejemplo, un crecimiento celular reducido (medido, por ejemplo, como recuentos de colonias en agar blando o utilizando sistemas de análisis celular tales como los de Guava Technologies, Hayward, CA), cambios del estadio del ciclo celular (medidos, por ejemplo, utilizando análisis de imágenes teñidas con anticuerpo HT, por ejemplo de Cellomics, Pittsburgh, PA, o mediante métodos citológicos estándares), o cambios de la expresión de proteínas, incluyendo, por ejemplo, la transferencia western o la microscopía.

Crecimiento en agar blando o formación de colonias en suspensión

Las células normales requieren un sustrato sólido para engancharse y crecer. Las células neoplásicas han perdido este fenotipo y crecen desenganchadas del sustrato. Por ejemplo, las células neoplásicas pueden crecer en cultivo en suspensión agitada o suspendidas en medios semisólidos, tales como agar semisólido o blando. Las células neoplásicas, al transfectarse con genes de supresor tumoral o al entrar en contacto con un antagonista de SENP1, pueden regenerar el fenotipo normal y requerir un sustrato sólido para engancharse y crecer. De esta manera, el crecimiento en agar blando o la formación de colonias en ensayos en suspensión pueden utilizarse para identificar los agentes que reducen o eliminan la proliferación y transformación celulares anormales, incluyendo el crecimiento en agar blando.

Las técnicas para el crecimiento en agar blando o la formación de colonias en ensayos en suspensión se describen en Freshney, *Culture of Animal Cells: a Manual of Basic Technique* (3a edición, 1994), incorporada como referencia en la presente memoria.

Inhibición por contacto y limitación por densidad del crecimiento

Las células normales típicamente crecen en un patrón plano y organizado en una placa de Petri hasta que entran en contacto con otras células. Al entrar en contacto mutuo las células, resultan inhibidas por contacto y detienen su crecimiento. Sin embargo, al transformar las células, éstas no resultan inhibidas por contacto y continúan creciendo hasta densidades elevadas en focos desorganizados. De esta manera, las células transformadas crecen hasta una densidad de saturación más alta que las células normales. Esto puede detectarse morfológicamente por la formación de una monocapa desorientada de células o células redondeadas en focos dentro del patrón regular de las células circundantes normales. Alternativamente, puede utilizarse el índice de marcaje con (³H)-timidina a la densidad de saturación para medir la limitación por densidad del crecimiento (ver Freshney, *supra*, 1994). Las células transformadas, al ser transfectadas por genes de supresión tumoral, regeneran un fenotipo normal y resultan inhibidas por contacto y crecerían hasta una densidad más baja.

El índice de marcaje con (³H)-timidina a la densidad de saturación puede utilizarse para medir la limitación por densidad del crecimiento. Por ejemplo, las células huésped transformadas pueden ponerse en contacto con un candidato a antagonista de SENP1 y después cultivarse durante un periodo de tiempo (por ejemplo 24 horas) hasta la densidad de saturación en condiciones de medio no limitante. El porcentaje de células marcadas con (³H)-timidina puede determinarse autorradiográficamente (ver Freshney, *supra*, 1994).

Dependencia de factor de crecimiento o de suero

Las células transformadas presentan una dependencia del suero más baja que sus contrapartidas normales (ver, por ejemplo, Temin, J. Natl. Cancer Inst. 37:167-175, 1966; Eagle *et al.*, J. Exp. Med. 131:836-879, 1970; Freshney, *supra*). Esto en parte se debe a la liberación de diversos factores de crecimiento por parte de las células transformadas. La dependencia de factor de crecimiento o de suero de las células que entran en contacto con un candidato a antagonista de SENP1 puede compararse con la de un control.

Niveles de marcadores específicos tumorales

Los tumores o las células neoplásicas liberan una cantidad incrementada de determinados factores (en lo sucesivo denominados "marcadores específicos tumorales") en comparación con sus contrapartidas normales. Por ejemplo, se libera un activador del plasminógeno (PA) del glioma humano a un nivel más alto que de las células cerebrales normales (ver, por ejemplo, Gullino, *Angiogenesis, tumor vascularization, and potential interference with tumor growth*, en: *Biological Responses in Cancer*, páginas 178 a 184, Mihich (editor), 1985). De manera similar, se libera factor de angiogénesis tumoral (TAF) a un nivel más alto en las células tumorales que en sus contrapartidas normales (ver, por ejemplo, Folkman, *Angiogenesis and Cancer*, Sem. Cancer Biol., 1992).

Se describen diversas técnicas que miden la liberación de estos factores en Freshney, *supra*, 1994. Ver, además, Unkless *et al.*, J. Biol. Chem. 249:4295-4305, 1975; Strickland y Beers, J. Biol. Chem. 251:5694-5702, 1976; Whur *et al.*, Br. J. Cancer 42:305-312, 1980; Gullino, Angiogenesis, tumor vascularization, and potential interference with tumor growth, en: Biological Responses in Cancer, páginas 178 a 184, Mihich (editor), 1985; Freshney, Anticancer Res. 5:111-130, 1985.

Invasividad en matrigel

El grado de invasividad en matrigel o en algún otro constituyente de la matriz extracelular puede utilizarse en un ensayo para identificar los antagonistas de SENP1. Las células tumorales muestran una buena correlación entre la malignidad y la invasividad de las células en matrigel o en algún otro constituyente de la matriz extracelular. En este ensayo pueden utilizarse células neoplásicas, en las que una invasividad reducida de las células tras entrar en contacto con un agente puede indicar que el agente es un antagonista de SENP1.

Pueden utilizarse las técnicas descritas en Freshney, *supra*, 1994. Brevemente, puede medirse el nivel de invasión de las células huésped mediante la utilización de filtros recubiertos con matrigel o con algún otro constituyente de la matriz extracelular. La penetración en el gel, o a través de la cara distal del filtro, se cuantifica como estimación de invasividad, y se estima histológicamente a partir del número de células y la distancia desplazada, o mediante marcaje previo de las células con ^{125}I y realización posterior de un recuento de la radioactividad en la cara distal del filtro o en el fondo de la placa (ver, por ejemplo, Freshney, *supra*, 1994).

4. Validación

Los agentes identificados inicialmente mediante cualquier de los métodos de cribado anteriormente indicados pueden someterse a ensayo adicionalmente para validar la actividad aparente. En algunas realizaciones, dichos estudios se realizan utilizando modelos animales adecuados. El formato básico de dichos métodos implica administrar un compuesto cabeza de serie identificado durante un cribado inicial en un animal que sirve como modelo de la enfermedad humana que debe tratarse y después se determina si SENP1 se encuentra de hecho modulada y/o si la enfermedad o condición mejora. Los modelos animales utilizados en los estudios de validación generalmente son mamíferos de cualquier tipo. Entre los ejemplos específicos de animales adecuados se incluyen, aunque sin limitación, primates, ratones y ratas.

5. Agentes que interactúan con SENP1

Los agentes sometidos a ensayo como moduladores de SENP1 pueden ser cualquier compuesto químico pequeño, o una entidad biológica, tal como un polipéptido (por ejemplo un péptido), azúcar, ácido nucleico (incluyendo, por ejemplo, ARNs o polinucleótidos antisentido) o lípido. Puede utilizarse esencialmente cualquier compuesto químico como modulador potencial (por ejemplo antagonista) o ligando en los ensayos de la invención, aunque con más frecuencia se utilizan compuestos que pueden disolverse en soluciones acuosas u orgánicas (especialmente basadas en DMSO). Los ensayos se diseñan para cribar bibliotecas químicas grandes mediante la automatización de las etapas de ensayo y proporcionando compuestos de cualquier fuente conveniente para los ensayos, que típicamente se realizan en paralelo (por ejemplo en formatos de microtitulación, o en placas de microtitulación en ensayos robotizados). Se apreciará que existen muchos proveedores de compuestos químicos, incluyendo Sigma (St. Louis, MO), Aldrich (St. Louis, MO), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Fluka Chemika-Biochemica Analytika (Buchs, Suiza) y similares.

En algunas realizaciones, los agentes presentan un peso molecular inferior a 1.500 daltons, y en algunos casos inferior a 1.000, 800, 600, 500 ó 400 daltons. El tamaño relativamente reducido de los agentes puede resultar deseable debido a que las moléculas más pequeñas presentan una probabilidad más alta de presentar propiedades físicoquímicas compatibles con buenas características farmacocinéticas, incluyendo la absorción oral, que los agentes que presentan un peso molecular más alto. Por ejemplo, los agentes que es menos probable que presenten éxito como fármacos basándose en la permeabilidad y solubilidad han sido descritos por Lipinski *et al.* de la manera siguiente: que presentan más de 5 donantes de enlaces de H (expresado como la suma de OHs y NHs), que presentan un peso molecular superior a 500, que presentan un logP superior a 5 (o un MLogP superior a 4,15) y/o que presentan más de 10 aceptores de enlaces de H (expresado como la suma de Ns y Os) (ver, por ejemplo, Lipinski *et al.*, Adv. Drug Delivery Res. 23:3-25, 1997).

En algunas realizaciones, los métodos de cribado de alto rendimiento implican proporcionar una biblioteca combinatorial química o de péptidos que contiene un gran número de potenciales compuestos terapéuticos (compuestos moduladores o ligandos potenciales). Dichas "bibliotecas químicas combinatoriales" o "bibliotecas de ligandos" seguidamente se criban en uno o más ensayos, tal como se describe en la presente memoria, para identificar aquellos miembros de la biblioteca (especies o subclases químicas particulares) que muestran una actividad característica deseada. Los compuestos identificados de esta manera pueden servir como "compuestos cabeza de serie" convencionales o pueden ser utilizados ellos mismos como terapéuticos potenciales o reales.

Una biblioteca química combinatorial es una colección de diversos compuestos químicos generados mediante síntesis química o síntesis biológica, mediante la combinación de varios "bloques constructivos" químicos, tales como reactivos. Por ejemplo, se forma una biblioteca química combinatorial lineal, tal como una biblioteca de polipéptidos, mediante la combinación de un conjunto de bloques constructivos químicos (aminoácidos) de todas las posibles

maneras para una longitud de compuesto dada (es decir, el número de aminoácidos en un compuesto polipeptídico). Pueden sintetizarse millones de compuestos químicos mediante dicha mezcla combinatorial de bloques constructivos químicos.

La preparación y cribado de bibliotecas combinatoriales químicas son bien conocidos para el experto en la materia. Entre dichas bibliotecas combinatoriales químicas se incluyen, aunque sin limitación, bibliotecas de péptidos (ver, por ejemplo, la patente US n° 5.010.175; Furka, *Int. J. Pept. Prot. Res.* 37:487-493, 1991, y Houghton *et al.*, *Nature* 354:84-88, 1991). También pueden utilizarse otras compuestos químicos para generar bibliotecas de diversidad química. Entre dichos compuestos químicos se incluyen, aunque sin limitación: peptoides (por ejemplo la publicación de patente PCT n° WO 91/19735), péptidos codificados (por ejemplo la publicación de patente PCT n° WO 93/20242), biooligómeros aleatorios (por ejemplo la publicación de patente PCT n° WO 92/00091), las benzodiazepinas (por ejemplo la patente US n° 5.288.514), diversómeros, tales como hidantoínas, benzodiazepinas y dipéptidos (Hobbs *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90:6909-6913, 1993), polipéptido vinílogos (Hagihara *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.* 114:6568, 1992), peptidomiméticos no peptídicos con andamiaje de glucosas (Hirschmann *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.* 114:9217-9218, 1992), síntesis orgánicas análogas de bibliotecas de compuestos pequeños (Chen *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.* 116:2661, 1994), oligocarbamatos (Cho *et al.*, *Science* 261:1303, 1993) y/o fosfonatos de peptidilo (Campbell *et al.*, *J. Org. Chem.* 59:658, 1994), bibliotecas de ácidos nucleicos (ver Ausubel, Berger y Sambrook, todos *supra*), bibliotecas de péptidos de ácidos nucleicos (ver, por ejemplo, la patente US n° 5.539.083), bibliotecas de anticuerpos (ver, por ejemplo, Vaughn *et al.*, *Nature Biotechnology* 14:309-314, 1996, y la patente PCT n° US 96/10287), bibliotecas de carbohidratos (ver, por ejemplo, Liang *et al.*, *Science* 274:1520-1522, 1996, y la patente US n° 5.593.853), bibliotecas de moléculas orgánicas pequeñas (ver, por ejemplo, benzodiazepinas, patente US n° 5.549.974; pirrolidinas, patentes US n° 5.525.735 y n° 5.519.134; compuestos morfolino, patente US n° 5.506.337; benzodiazepinas, n° 5.288.514, y similares).

Los dispositivos para la preparación de bibliotecas combinatoriales se encuentran comercialmente disponibles (ver, por ejemplo, 357 MPS, 390 MPS, Advanced Chem. Tech., Louisville, KY; Symphony, Rainin, Woburn, MA; 433A, Applied Biosystems, Foster City, CA, 9050; Plus, Millipore, Bedford, MA). Además, numerosas bibliotecas combinatoriales se encuentran ellas mismas comercialmente disponibles (ver, por ejemplo, ComGenex, Princeton, N.J.; Tripos Inc., St. Louis, MO; 3D Pharmaceuticals, Exton, PA; Martek Biosciences, Columbia, MD, etc.).

SENP1 se encuentra estructuralmente relacionado con la familia de proteínas de la ubiquitina y esta similitud puede utilizarse para ayudar a diseñar antagonistas de SENP1. La familia de modificadores similares a ubiquitinas pequeñas (Ub1) (SUMO, revisadas en Muller S. *et al.*, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2:202-210, 2001) y Yeh E.T. *et al.*, *Gene* 248:1-14, 2000), de entre los que SENP1 es un miembro, se relaciona con la familia de las ubiquitinas. Aunque la identidad de secuencias entre las dos familias es <20%, las estructurales globales son muy similares (2,1 Å rmsd para los residuos del núcleo [21 a 93 y 1 a 72 de SUMO-1 y de la ubiquitina, respectivamente] (Bayer P. *et al.*, *J. Mol. Biol.* 280:275-286, 1998). Ambas proteínas se unen covalentemente mediante su grupo -COOH C-terminal al grupo ϵ -NH₂ de una cadena lateral de una lisina (enlace isopeptídico) de la proteína diana. La ubiquitina y la SUMO presentan motivos diglicina conservados próximos al extremo C-terminal. La conjugación de ubiquitina y SUMO es un procedimiento complejo que implica varias etapas: corte de la cola de C, activación, y transferencia final (Johnson E.S. *et al.*, *Embo J.* 16:5509-5519, 1997; Gong L. *et al.*, *FEBS Lett.* 448:185-189, 1999).

Al contrario que la ubiquitina, las SUMOs no forman uniones poliméricas debido a la sustitución del equivalente a Lys-48 de la ubiquitina por Gln. Las rutas de la SUMO y de la ubiquitina difieren principalmente en la consecuencia de la modificación: el resultado mejor caracterizado de la ubiquitinación es el direccionamiento de la proteína etiquetada al proteasoma 26S para la degradación. Las proteínas SUMOizadas no se destinan a la degradación.

Se han identificado tres genes SUMO en el ser humano (ver la Tabla 1 para los números de acceso). Existe una similitud/identidad de secuencia de 62,0%/49,0% entre Smt3 y la SUMO-1 humana (ver la Tabla 2). Se ha obtenido la estructura solución para la SUMO-1 humana (Bayer P. *et al.*, *J. Mol. Biol.* 280:275-286, 1998).

TABLA 1

Secuencias (números de acceso de SWISSPROT), motivos Pfam y estructuras (archivos PDB)

Secuencia/motivo/estructura	Descripción
YEASTGP:ULP1	Ulp1 de <i>S. cerevisiae</i>
YEASTGP:ULP2	Ulp1 de <i>S. cerevisiae</i>
SW_HUM:SEN1_HUMAN	SENP1 de <i>H. sapiens</i>
SW_HUM:SEN2_HUMAN	SENP2 de <i>H. sapiens</i>
SW_HUM:SEN3_HUMAN	SENP3 de <i>H. sapiens</i>
SW_HUM:SEN5_HUMAN	SENP5 de <i>H. sapiens</i>

ES 2 345 720 T3

	SW_HUM:SEN6_HUMAN	SEN6 de <i>H. sapiens</i>
	SW_HUM:SEN7_HUMAN	SEN7 de <i>H. sapiens</i>
5	SW_HUM:SEN8_HUMAN	SEN8 de <i>H. sapiens</i>
	PF02902	Pfam Ulp1_C (familia de SENP)
	1 euv.pdb	Estructura de rayos X de Ulp1-Smt3 de levadura
10	PF00443	Hidrolasa carboxilo-terminal de la ubiquitina Pfam (familia de UCH)
15	SW_HUM:UBL3_HUMAN (P15374)	Hidrolasa carboxilo-terminal, isozima L3, de la ubiquitina de <i>H. sapiens</i>
20	SW_HUM:UBL1_HUMAN (P09936)	Hidrolasa carboxilo-terminal, isozima L1, de la ubiquitina de <i>H. sapiens</i>
25	SW_HUM:UBL5_HUMAN (Q9y5k5)	Hidrolasa carboxilo-terminal, isozima L5, de la ubiquitina de <i>H. sapiens</i>
30	luch.pdb	Estructura de rayos X de UCH-L3 de <i>H. sapiens</i>
35	1cmx.pdb	Estructura de rayos X de aldehído de UCH-ubiquitina de levadura
40	SW_HUM:SM33_HUMAN	SUMO-1 de <i>H. sapiens</i>
	SW_HUM:SM32_HUMAN	SUMO-? de <i>H. sapiens</i> (Sentrina 2)
	SW_HUM:SM31_HUMAN	SUMO-? de <i>H. sapiens</i>
45	YEASTGP:SMT3	Smt3 de <i>S. cerevisiae</i>
	SW_HUM:UBIQ_HUMAN	Ubiquitina de <i>H. sapiens</i>
	PF00240	Familia de la ubiquitina Pfam
50	1a5r.pdb	Estructura de RMN de SUMO-1 de <i>H. sapiens</i> (Sm33)

ES 2 345 720 T3

TABLA 2

Matriz de similitud/identidad de secuencias para Sm (SUMO) de H. sapiens y Smt3 de S. cerevisiae.
Por ejemplo: Sm31 y Sm32 presentan una similitud de 98,94% y una identidad de 96,81%

5								
		s	s	s	l	l	u	
		m	m	m	a	e	b	
10		3	3	3	5	u	i	
		1	2	3	r	v	q	
		-	-	-			-	
		h	h	h			h	
15		u	u	u			u	
		m	m	m			m	
		a	a	a			a	
		n	n	n			n	
20	sm31_human		96,81	48,96	48,96	48,10	15,79	3huecos
	sm32_human	98,94		50,00	50,00	46,84	15,79	3huecos
	sm33_human	65,62	64,89		100,00	50,63	18,42	3huecos
25	la5r	65,62	64,89	100,00		50,63	18,42	2huecos
	leuv	62,03	63,29	65,82	65,82		13,33	4huecos
	ubiq_human	39,47	39,47	42,11	42,11	37,33		2huecos

30 La SUMOilación es un proceso reversible dinámico. El corte de SUMO respecto de su diana (la deSUMOilación) se encuentra catalizada por las cisteína proteasas denominadas ULP ("proteasas de tipo ubiquitina") en levaduras y SENPs o SUSPs ("proteasas específicas de sentrina/SUMO") en el ser humano (Li S.J. y M. Hochstrasser, Nature 398:246-251, 1999; Bailey D. y P. O'Hare, J. Biol. Chem. 279:692-703, 2004). Se han identificado dos ULPs en la levadura (Ulp1 y Ulp2) y por lo menos siete SENPs en el ser humano (ver la Tabla 1). Dichas proteasas desempeñan un papel doble en la ruta de la SUMOilación: el procesamiento de la cola C-terminal para generar el motivo diglicina, y la desconjugación mediante hidrólisis del enlace isopeptídico Gly-Lys. No cortan los enlaces isopeptídicos de la ubiquitina. En la levadura, la función desconjugadora de Ulp1 resulta esencial (Li S.J. y M. Hochstrasser, Nature 398:246-251, 1999). Resulta razonable conjeturar que las diversas y diferentes SENPs en mamíferos han evolucionado para funcionar con diferentes formas de SUMO. Además, la localización subcelular ejerce una limitación fisiológicamente significativa de la especificidad de la SUMO isopeptidasa. Por ejemplo, SENP1 puede desconjugar SUMO-1 de Ran GAP1 *in vitro*, pero no *in vivo*. Esto se atribuye al hecho de que Ran GAP 1 se encuentra unida a las fibrillas citoplasmáticas del complejo poro nuclear, mientras que SENP1 se localiza en el núcleo (Gong L. *et al.*, J. Biol. Chem. 275:3355-3359, 2000). Una señal de localización nuclear (NLS1) en SENP1 se encuentra situada en la posición 171-177.

Una alineación de las siete SENP humanas y de dos secuencias ULP indica conservación en el dominio catalítico C-terminal nuclear (residuos 420 a 643 en SENP1, ver la Tabla 3) que presenta los residuos absolutamente conservados Cys, His y Asp, que forman la tríada catalítica, y un Gln que forma el agujero oxianión en el sitio activo (Gong L. *et al.*, J. Biol. Chem. 275:3355-3359, 2000). El dominio N-terminal variable se cree que desempeña un papel regulador, debido a que la expresión del dominio catalítico C-terminal por sí solo conduce a niveles más bajos de SUMO-1, indicativos de actividad catalítica constitutiva (Bailey D. y P. O'Hare, J. Biol. Chem. 279:692-703, 2004).

ES 2 345 720 T3

TABLA 3

Matriz (inferior/superior) de similitud/identidad de secuencias para las familias de SENP de *H. sapiens* y ULP de *S. cerevisiae*. Por ejemplo: SENP1 y SENP2 presentan una similitud de 73,71% y una identidad de 60,3%

		s	s	s	s	s	s	s	u	l
		e	e	e	e	e	e	e	l	e
10		n	n	n	n	n	n	n	p	u
		p	p	p	p	p	p	p	2	v
		l	l	l	l	l	l	l	-	
		-	-	-	-	-	-	-	y	
15		h	h	h	h	h	h	h	e	
		u	u	u	u	u	u	u	a	
		m	m	m	m	m	m	m	s	
		a	a	a	a	a	a	a	t	
		n	n	n	n	n	n	n		
20	senp1_huma		60,31	43,62	43,62	30,21	31,41	21,79	27,03	37,57
	24huecos									
	senp2_huma	73,71		37,23	36,17	30,73	30,37	20,11	27,57	35,84
	23huecos									
25	senp3_huma	65,96	56,38		62,18	29,79	26,74	22,29	27,07	27,75
	23huecos									
	senp5_huma	62,23	55,85	76,68		31,91	30,11	22,29	25,56	28,32
	23huecos									
30	senp6_huma	56,77	52,08	52,66	54,79		57,43	24,86	29,63	29,94
	23huecos									
	senp7_huma	53,93	50,26	48,13	52,15	72,28		22,95	29,26	31,43
	23huecos									
35	senp8_huma	40,22	36,87	44,00	39,43	44,32	46,45		21,71	21,39
	23huecos									
	ulp2_yeast	50,81	45,41	51,38	46,67	54,50	50,00	40,00		30,99
	15huecos									
40	1euv	54,34	54,91	46,24	46,82	48,02	51,43	38,73	47,95	
	19huecos									

La estructura de un complejo entre Ulp1 y Smt3 de levadura ha sido resuelta (ver, por ejemplo, Mossessova E. y C.D. Lima, Mol. Cell 5:865-876, 2000). Esta estructura y las alineaciones de secuencias indicadas anteriormente se utilizaron para generar modelos de homología de la SENP1 y la SUMO-1 humanas utilizando Moloc (Gerber P.R. y K. Muller, J. Comput. A ided Mol. Des. 9:251-268, 1995). Las interacciones observadas en el sitio activo de la SENP1 humana modelada con el sustrato SUMO-1 son muy similares en las estructuras experimental de levadura y modelada humana (ver la Tabla 4). Existen múltiples enlaces de hidrógeno que implican los residuos Glu93 y Gln94 de SUMO-1, pero muy poca interacción con Thr95. La Tabla 4 también lista los residuos homólogos en otros miembros de la familia de SENP y realiza una predicción sobre si estas interacciones de enlace de hidrógeno con Glu93-Gln94 se encuentran conservadas. Basándose en este análisis, se predice muy poca reactividad cruzada para SUMO-1 con otros miembros de la familia de SENP1, debido a que faltan dos de los cuatro enlaces de hidrógeno críticos. Específicamente, este análisis indica que un sustrato/inhibidor EQTGG resultaría altamente específico para SENP1 y Ulp1 y no reaccionaría cruzadamente con otros miembros de la familia de proteasas específicas de sentrina/SUMO humana. De esta manera, en algunas realizaciones, los antagonistas de SENP1 de la invención comprenden la secuencia EQTGG, o miméticos de la misma.

ES 2 345 720 T3

TABLA 4

Interacciones de enlace de hidrógeno de complejo SENP1/SUMO-1 modelado por homología con la secuencia parcial -EQTGG de sustrato/inhibidor propuesto. El texto en negrita indique la interacción de enlace de hidrógeno se encuentra conservado con este residuo

residuo de SENP1	N467	K455	T499	T495
Detalles de interacción (SENPlres:atom-SUMOres:atom)	N467:Nδ2-E63:Oε1	K455:Nζ-E93:Oε2	T499:Oδ1-Θ94:Nε2	T495:Oδ1-Θ94:Oε1
residuo de SENP2	N412	G400	P444	T440
residuo de SENP3	N403	D391	D431	S427
residuo de SENP5	N584	D572	R612	S608
residuo de SENP6	N683	E671	K716	S712
residuo de SENP7	N711	E699	K744	S740
residuo de SENP8	N28	S16	Q60	P56
residuo de Ulp1	N450	R438	T477	S473

Tal como se ha indicado anteriormente, en vista de dicha información, existen varios enfoques para desarrollar un inhibidor de SENP1. En algunas realizaciones, debido a que las estructuras se encuentran disponibles tanto para la SUMO-1 humana (dominio C-terminal, RMN (Bayer P. *et al.*, J. Mol. Biol. 280:275-286, 1998) y para el homólogo de levadura del complejo SENP1/SUMO-1 (rayos X (Mossessova E. y C.D. Lima, Mol. Cell 5:865-876, 2000), el experto en la materia podrá realizar el diseño de un inhibidor basándose en la estructura, así como realizar un cribado virtual de los compuestos para un efecto inhibidor predicho.

En algunas realizaciones, los antagonistas de SENP1 de la invención comprenden un aldehído. Los aldehídos son inhibidores potentes de las cisteína proteasas debido a que forman tiohemiacetales. Estos compuestos covalentes estables imitan el estado de transición. Entre los ejemplos en los que se han utilizado aldehídos para elucidar el mecanismo de las cisteína proteasas se incluyen la papaína (Schroder E. *et al.*, FEBS Lett. 315:38-42, 1993) y la ubiquitina hidrolasa carboxilo-terminal (Pickart C.M. y I.A. Rose, J. Biol. Chem. 261:10210-10217, 1986). Se utilizó la reducción del sustrato Smt3 con NaBH₄ para formar el aldehído C-terminal con el fin de generar un estado de transición estable análogo para estudios de cocristalización con Ulp1 de levadura (Mossessova E. y C.D. Lima, Mol. Cell 5:865-876, 2000). Por lo tanto, un aldehído Gly-Gly podría servir como potente inhibidor de la SENP1 cisteína proteasa.

Los tres aminoácidos situados cadena arriba del Gly-Gly C-terminal de SUMO-1 (Glu-Gln-Thr) o de un mimético del mismo, pueden utilizarse en un inhibidor debido a que estos residuos contribuyen significativamente a la especificidad de la interacción SENP1/SUMO-1 (Tablas 4 y 5). Aunque Thr95 no interactúa fuertemente con SENP1, proporciona el espaciado correcto entre el enlace peptídico escindible y los residuos Glu93-Gln95.

TABLA 5

Secuencia C-terminal de las tres proteínas SUMO de H. sapiens. La secuencia correspondiente a x1-x3 en la figura 3 se encuentra subrayada; el motivo diglicina se muestra en negrita

Sm31	TIDVFQQQT GG VPESLAGHSF
Sm32	TIDVFQQQT GG VY
Sm33	VIEVYQEQT GG HSTV
Smt3	IIEAHREQ IG GATY

Aunque la estructura del complejo SENP1/SUMO-1 indica que la lisina y sus residuos flanqueantes de la proteína diana no interactúan con SENP1, un diseño alternativo de inhibidor podría incluir estos aminoácidos o grupos para imitar sus grupos funcionales.

5 Un posible medio para validar la especificidad es cribar virtualmente para la unión del inhibidor de SENP1 propuesto a una familia de proteínas altamente relacionadas con SENP1 en estructura, función y mecanismo, tal como las ubiquitina hidrolasas carboxilo-terminales (motivo UCH de Pfam, PF00443). Una búsqueda de la base de datos Swissprot revela tres secuencias pertenecientes a la familia UCH humana (Tabla 1). Se ha resuelto la estructura de varias UCHs, incluyendo el isozima UCH-L3 humano (Johnston S.C. *et al.*, *Embo J.* 16(13):3787-96, 1997) y el enzima de levadura acomplejado con el aldehído C-terminal de la ubiquitina (Johnston S.C. *et al.*, *Embo J.* 18:3877-3887, 1999). Pudieron construirse los modelos de homología para los demás miembros de la familia utilizando estas estructuras de rayos X a modo de molde. Un inhibidor altamente específico del inhibidor de SENP1 podría interactuar favorablemente con SENP1, pero no con cualquier UCH. De esta manera, en algunas realizaciones, los métodos de cribado de la invención comprenden además la selección de un agente que se une y/o inhibe SENP1 pero que no inhibe por lo menos una ubiquitina hidrolasa carboxilo-terminal.

La localización nuclear de SENP1 desempeña un papel en su especificidad de sustrato. Por lo tanto, en algunas realizaciones, para garantizar la mínima reactividad cruzada del inhibidor propuesto con otras cisteína proteasas, puede utilizarse la secuencia de localización nuclear propia de SENP1 (NSL1, PKKTQRR) como parte del inhibidor en un diseño de caballo de Troya. Esta secuencia heptapéptido, al ser modelada en la estructura de SUMO-1 del complejo modelado por homología SENP1-SUMO1, muestra únicamente un solapamiento estérico que implica la Arg6' del inhibidor con la Lys500 de SENP1. Sin embargo, existe suficiente espacio para que el heptapéptido realice los ajustes conformacionales que eviten dichas interacciones estéricas o de carga no deseadas debido a que faltarían los primeros 92 aminoácidos de SUMO-1. Por consiguiente, en algunos casos, un inhibidor de SENP1 comprende uno o más de los siguientes: 1) un aldehído Gly-Gly, 2) la secuencia Glu-Gln-Thr, o un mimético de la misma, y/o 3) una señal de localización nuclear, tal como PKKTQRR.

IX. Composiciones farmacéuticas y administración

30 Pueden administrarse directamente en el sujeto mamífero antagonistas de SENP1 para el tratamiento de cánceres, incluyendo, por ejemplo, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de páncreas y cáncer de intestino delgado. La administración puede realizarse mediante cualquiera de las vías utilizadas normalmente para introducir un quimioterapéutico u otro fármaco anticáncer en contacto final con el tejido que debe tratarse. Aunque puede utilizarse más de una vía para administrar una composición particular, una vía particular con frecuencia proporciona una reacción más inmediata y más eficaz que otra vía. Los antagonistas de SENP1 pueden administrarse en un individuo en forma de único ingrediente activo o en combinación con agentes quimioterapéuticos u otros agentes anticáncer.

40 Por lo tanto, es un objetivo de la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un antagonista de SENP1 y un portador farmacéuticamente aceptable. En otra realización de la invención, se proporciona un antagonista de SENP1 para la utilización en medicina. En otra realización de la invención, se utiliza un antagonista de SENP1 en la preparación de un medicamento o para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer, en particular de cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, y cáncer de intestino delgado. Resulta particularmente preferente el cáncer de vejiga.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender un portador farmacéuticamente aceptable. Los portadores farmacéuticamente aceptables se determinan en parte a partir de la composición particular que se administra, así como por el método particular utilizado para administrar la composición. Por consiguiente, existe una amplia diversidad de formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas de la presente invención (ver, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17a edición, 1985).

55 Los antagonistas de SENP1, solos o en combinación con otros componentes adecuados, pueden prepararse en formulaciones de aerosol (es decir, pueden "nebulizarse") para administrarse mediante inhalación. Las formulaciones de aerosol pueden introducirse en propelentes aceptables presurizados, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similar.

Entre las formulaciones adecuadas para la administración se incluyen soluciones acuosas y no acuosas, soluciones isotónicas estériles, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que conviertan la formulación en isotónica, y suspensiones acuosas y no acuosas estériles que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizadores, agentes espesantes, estabilizadores y conservantes. En la práctica de la presente invención, pueden administrarse composiciones, por ejemplo, por vía oral, nasal, tópica, intravenosa, intraperitoneal o intratecal. Las formulaciones de antagonistas pueden presentarse en recipientes sellados unidos o multidosis, tales como ampollas y viales. Pueden prepararse soluciones y suspensiones a partir de polvos estériles, gránulos y tabletas del tipo anteriormente indicado. Los antagonistas también pueden administrarse como parte de un alimento preparado o fármaco.

La dosis administrada en un paciente, en el contexto de la presente invención, debería resultar suficiente para producir una respuesta beneficiosa en el sujeto durante un periodo de tiempo. El nivel óptimo de dosis para cada paciente de-

pendará de una diversidad de factores, incluyendo la eficacia del antagonista específico utilizado, la edad, peso corporal, actividad física y dieta del paciente, de una posible combinación con otros fármacos, y de la severidad de la enfermedad particular. El tamaño de la dosis también estará determinada por la existencia, naturaleza y grado de los efectos secundarios adversos que acompañan a la administración de un compuesto o vector particular en un sujeto particular.

Al determinar la cantidad eficaz del antagonista que debe administrarse, el médico puede evaluar los niveles plasmáticos circulantes del antagonista, la toxicidad del mismo y la producción de anticuerpos anti-antagonista. En general, la dosis equivalente de un antagonista es de entre aproximadamente 1 ng/kg y 10 mg/kg para un sujeto típico. La administración puede realizarse mediante dosis únicas o divididas.

Ejemplos

Ejemplo 1

Asociación de la expresión de SENP1/telomerasa con el cáncer de vejiga

El trabajo de los presentes inventores demuestra la presencia de un nivel incrementado de ARNm de la proteasa específica de sentrina/SUMO (SENP1) en el sedimento urinario de pacientes con cáncer de vejiga, quienes presentan tumores que no expresan niveles medibles de ARNm de telomerasa (TERT) en el sedimento urinario. De esta manera, la medición de SENP1 puede utilizarse para diagnosticar, realizar un seguimiento y evaluar el pronóstico de cánceres, particularmente, aunque no necesariamente de manera exclusiva, en casos en los que no se expresa TERT.

El trabajo actual de los presentes inventores demuestra que un incremento de la expresión de ARNm de SENP1 se asocia a células procedentes de tumores que no expresan niveles detectables de ARNm de telomerasa. Al saber de los presentes inventores, ésta es la primera demostración de que SENP1 presenta un nivel incrementado en muestras negativas para telomerasa procedentes de pacientes de cáncer. En el presente contexto, SENP1 proporciona un marcador útil en ensayos diagnósticos, de seguimiento y pronósticos del cáncer. Además, debe indicarse que la expresión de la telomerasa en tumores no excluye necesariamente la sobreexpresión de SENP1. Por lo tanto, la sobreexpresión de SENP1 es un marcador útil para la detección de algunos tumores que son positivos para la telomerasa.

Se obtuvo orina (100 ml) de sujetos humanos que se encontraban sanos o se les había diagnosticado cáncer de vejiga. Se recogieron células de estas muestras mediante centrifugación a baja velocidad (700xg durante 10 minutos) y se enjuagaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato. Las células se lisaron en tampón de lisis proporcionado en el kit de ARN total Roche HighPure. El ARN total se purificó utilizando el kit de ARN total Roche HighPure. Las muestras se sometieron a ensayo mediante reacción en cadena de la polimerasa-transcripción inversa (RT-PCR) cuantitativa en tiempo real para la expresión del gen codificante de la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT), y la expresión de la proteína fosfatasa 1, subunidad catalítica, isoforma alfa (PPP1CA), un gen utilizado para realizar el seguimiento del rendimiento de ARN de las muestras.

Para el presente estudio, se analizaron diecinueve muestras negativas para telomerasa procedentes de pacientes de cáncer de vejiga y diecinueve muestras negativas para telomerasa procedentes de sujetos sanos mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Las condiciones experimentales en cada ensayo fueron las siguientes: reacciones de 100 µl que contenían bicina 50 mM, pH 8,0, acetato de potasio 115 mM, glicerol al 8%, acetato de manganeso 3 mM, 200 µM de cada uno de desoxiadenosina trifosfatos, desoxiciditina trifosfato, desoxiguanosina trifosfato, y 500 µM de desoxiuridina trifosfato, 2 unidades de uracil-N-glucosilasa (UNG) de Applied Biosystems, 10 unidades de ADN polimerasa rTth (forma recombinante de la ADN polimerasa de *Thermus thermophilus*, de Applied Biosystems), sonda 5' nucleasa 10 nM, 200 nM de cada cebador, directo e inverso. Se transcribió inversamente el ARN de SENP1, se amplificó y se detectó con una sonda marcada fluorescentemente.

Se corrieron ensayos en el ABI Prism 7700 con las condiciones de ciclado siguientes: una etapa inicial de incubación a 50°C durante 2 minutos para permitir la eliminación mediada por UNG de cualquier contaminación cruzada de producto de PCR, desnaturalización durante 1 minuto a 95°C, y una etapa de transcripción inversa de 30 minutos a 60°C, seguido de 50 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 20 segundos de hibridación/extensión a 60°C durante 40 segundos. Debe indicarse que dichas condiciones fijas de ensayo son arbitrarias, y que podrían obtenerse los mismos resultados con una diversidad de concentraciones de tampones, sales, glicerol/DMSO, nucleótidos, cebadores y sondas, transcriptasa inversas, enzimas ADN polimerasa, métodos de dos enzimas/un tubo o de dos enzimas/dos tubos para RT-PCR, con o sin UNG, utilizando magnesio o manganeso como catión divalente, diversas concentraciones de cebador/sonda, o secuencias y condiciones de termociclado. Las secuencias de los cebadores y sondas fueron las siguientes: para SENP1, CAAGAAGTGCAGCTTATAATCCAA (SEC ID n° 6, cebador "sentido" directo) y GTCTTTTCGGGTTTCGAGGTAA (SEC ID n° 7, cebador "antisentido" inverso), CTCAGACAGTTTCTTGGCTCAGGCG (SEC ID n° 8, sonda); para PPP1CA, GAGCACACCAGGTGGTAGAA (SEC ID n° 9, cebador directo), GGGCTTGAGGATCTGGAAA (SEC ID n° 10, cebador inverso), GAGTTTGACAATGCTGGCGCCATGATGAGT (SEC ID n° 11, sonda).

Se midieron los niveles de ARNm de SENP1 mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Se determinaron los números de copia relativos de SENP1 basándose en los estándares de cuantificación de ARN. Estos estándares consisten de transcritos run-off de PPP1CA de concentraciones conocidas, que han sido transcritos inversamente y amplificados mediante PCR bajo las mismas condiciones que las muestras experimentales. Se calcularon los valores

ES 2 345 720 T3

umbral de ciclo (C_t) para proporcionar una medida de la cantidad de ARNm que se encontraba presente al inicio de la reacción de amplificación. Debido a que las eficiencias de las reacciones de amplificación raramente son exactamente iguales, en caso de serlo alguna vez, al utilizar diferentes conjuntos de cebador/sonda o de estándares frente a muestras procedentes de sujetos humanos, debido a la posible presencia de inhibidores de la transcripción inversa que podrían contaminar la preparación de muestras en el último caso, los números de copia se indican como copias relativas de un transcrito dado en una muestra y no como un número de copia absoluto.

Tal como se muestra en la Tabla 1, la mediana del número de copias de SENP1 en sujetos sanos es 4, la mediana en pacientes de cáncer de vejiga negativos para telomerasa es 1.899 copias. Se calcula la mediana y no la media con el fin de mitigar el efecto de los valores extremos sobre los cálculos. La curva característica de receptor-operador para estas muestras (figura 1) (según determinación mediante los métodos de Agresti A., Categorical Data Analysis, páginas 228 a 230, 2002) muestra que los pacientes de cáncer de vejiga negativos para telomerasa pueden distinguirse de los sujetos sanos negativos para telomerasa basándose en SENP1. En una primera aproximación, este subconjunto de pacientes puede distinguirse entre dichos grupos con una sensibilidad de 100% y una especificidad de 90%.

TABLA I

Número relativo de copias de ARNm de SENP1 en sujetos sanos frente a pacientes de cáncer de vejiga negativos para telomerasa

	Pacientes de cáncer de vejiga negativos para telomerasa	Sujetos sanos
	N° de copias de SENP1	N° de copias de SENP1
	125	0
	201	0
	240	0
	304	0
	322	0
	655	0
	1.184	0
	1.413	0
	1.499	3
	1.899	4
	2.708	4
	2.873	5
	4.113	10
	4.610	10
	5.188	12
	5.839	21
	6.195	26
	9.941	380
	14.173	1.675
mediana	1.899	4

Estos datos también pueden normalizarse al nivel de un gen de mantenimiento presente en cada muestra. Dicha normalización contra las variaciones del número de células en la muestra inicial, cualquier degradación del ARN, o la presencia de inhibidores en la muestra. En este caso, se utilizó el nivel de PPP1CA medido previamente, bajo las mismas condiciones, para la normalización. Los cálculos fueron los siguientes: se dividió el número relativo de copias de ARNm de SENP1 en una muestra dada por el número relativo de copias de ARNm de PPP1CA en la misma muestra. Para facilitar la manipulación y el registro, este número se multiplicó por 1×10^5 . De esta manera, el número de copias normalizado para el ARNm de SENP1 mostrado en la Tabla II representa el número de copias de ARNm de SENP1 por 1×10^5 copias de ARNm de PPP1CA. La medida del número normalizado de copias de ARNm de SENP1

ES 2 345 720 T3

en sujetos sanos era de 1.096 y la mediana en pacientes de cáncer de vejiga negativos para telomerasa, de 11.994. La curva característica de receptor-operador para estos datos (figura 2) muestra que los pacientes de cáncer de vejiga negativos para telomerasa pueden distinguirse de los sujetos sanos negativos para telomerasa basándose en SENP1. En una primera aproximación, este subconjunto de pacientes puede distinguirse entre chicos grupos con una sensibilidad de 90% y una especificidad de 70%.

TABLA II

Número relativo de copias de ARNm de SENP1 normalizado a los niveles del gen de mantenimiento PPPICA en sujetos sanos frente a pacientes de cáncer de vejiga negativos para telomerasa

	Pacientes de cáncer de vejiga negativos para telomerasa	Sujetos sanos
	N° de copias de SENP1	N° de copias de SENP1
	2.017	0
	2.344	0
	3.242	0
	3.379	0
	3.509	0
	5.095	0
	6.892	0
	8.182	0
	10.413	137
	11.994	1.096
	15.370	1.445
	16.401	1.592
	17.827	2.257
	22.070	3.688
	22.378	4.561
	23.384	7.639
	26.195	10.591
	33.182	19.453
	76.298	47.093
mediana	11.994	1.096

Los resultados de los presentes inventores indican que SENP1 puede utilizarse como marcador para diferenciar los pacientes de cáncer de los pacientes sanos basándose en el ARNm encontrado en las células en muestras procedentes de los pacientes.

Ejemplo 2

Asociación de la expresión de SENP1 y/o de telomerasa con cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de páncreas y cáncer de intestino delgado

Se homogeneizaron 100 g de tejidos sólidos congelados, en 7,5 ml de solución Ultraspec (Biotex) durante 30 segundos. Se extrajo el ARN total utilizando el kit de ARN Biotex Ultraspec®. El ARN se purificó adicionalmente utilizando el kit RNeasy mini de QIAGEN (para un máximo de 100 µg de ARN total), incluyendo un tratamiento de ADNasa de QIAGEN. Se sintetizó ADNc utilizando 3 a 50 µg de ARN total por reacción, basándose en el método descrito en el kit de síntesis de ADNc de doble cadena Superscript™ de Invitrogen. Los reactivos se adquirieron de Invitrogen, a menos que se indique lo contrario. En la reacción de síntesis de la primera cadena, las concentraciones finales de los reactivos fueron las siguientes: cebador polidT 5 pM (Affymetrix n° 900375), 1X tampón de primera

cadena, DTT 0,01 M, 0,5 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, 400 unidades de ARNasa H-transcriptasa inversa SuperScript™ (SSRT), volumen total de reacción: 20 µl. Se incubó el cebador de primera cadena (1 µl) con ARN total (añadiendo agua libre de ARNasa para llevar el volumen a 10 µl) a 70°C durante 10 minutos, seguido de la incubación sobre hielo durante 2 minutos. Se añadió tampón de primera cadena, DTT y dNTPs, seguido de la incubación a 42°C durante 2 minutos. Tras la adición de SSRT II, las muestras se incubaron durante 1 hora a 42°C. A continuación, se llevó a cabo la síntesis de la segunda cadena. A la reacción completa de 20 µl procedente de la síntesis de la primera cadena se añadieron los reactivos siguientes a las concentraciones finales indicadas: 1X tampón de segunda cadena, 0,2 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, 10 U de ADN ligasa de *E. coli*, 40 U de ADN polimerasa I de *E. coli*, 2 U de ARNasa H, 20 U de ADN polimerasa de T4, volumen total de reacción: 150 µl. Todos los reactivos excepto la ADN polimerasa de T4 se mezclaron y se incubaron durante 2 horas a 16°C. A continuación, se añadió la ADN pol. de T4, seguido de una incubación a 16°C durante 5 minutos.

Para cada muestra, se purificaron los 150 µl completos de ADNc de doble cadena resultante mediante la utilización de Phase Lock gel (disponible de Brinkmann), de la manera siguiente: se mezclaron 150 µl de ADNc de doble cadena con un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se precipitó el ARN mediante métodos estándares utilizando acetato amónico y etanol, seguido de dos lavados con etanol helado al 100%. Se secó el pellet y se resuspendió en 2 a 10 µl de agua desionizada libre de ARNasa. Se cuantificó el ADNc mediante la medición de la DO₂₆₀.

Se realizó una PCR cuantitativa de las muestras bajo las condiciones siguientes: 7 ng de ADNc, 1X mezcla TaqMan® Universal Master Mix (la solución madre adquirida disponible de Applied Biosystems se consideró 2X), 2,4 µM de cada cebador GAPDH humano directo e inverso, y 0,5 µM de sonda TaqMan GAPDH humana, y los cebadores y sondas para un gen dado de interés se añadieron en el mismo tubo de reacción a las concentraciones indicadas para los cebadores y sondas GAPDH. Las secuencias de estos cebadores y sondas fueron: para SENP1, CAAGAAGTG CAGCTTATAATCCAA (cebador “sentido” directo) y GTCTTTCGGGTTTCGAGGTAA (cebador “antisentido” inverso), CTCAGACAGTTTTCTTGGCTCAGGCG (sonda TaqMan); para TERT, TGGGCACGTCCGCA (directo), GGCGTGGTGGCACATGAA (inverso), TCATCGAGCAGAGCTCCTCCCTGAATGAGG (sonda TaqMan). Todos los cebadores y sondas, incluyendo aquellos de un panel de siete genes de mantenimiento (ver posteriormente) se obtuvieron de ABI. El volumen total de cada ensayo fue de 20 µl. El ciclado se llevó a cabo en un sistema de detección de secuencias ABI Prism® 7900 HT. Tras una incubación inicial de 2 minutos a 50°C, se realizó una incubación de 10 minutos a 95°C, y después 40 a 55 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto.

Se calcularon los niveles relativos de expresión de ARNm de SENP1 y de TERT (a los que se hace referencia como genes de interés, o GOI), de la manera siguiente: se determinaron los valores umbral de ciclo (C_t) de la RT-PCR para SENP1, TERT, GAPDH y un panel de siete genes humanos “de mantenimiento”. Los siete genes eran: hipoxantina fosforibosiltransferasa, β-glucuronidasa, β2-microglobulina, fosfogliceratoquinasa, ciclofilina, β-actina y la proteína ribosómica de gran tamaño PO. Basándose en los C_s del panel de genes de mantenimiento, se ajustó el C_t de GAPDH para proporcionar el valor esperado. Este ajuste compensa cualquier pequeña diferencia inesperada en el C_t de GAPDH que pudiese explicarse porque GAPDH no se comporta como un gen de mantenimiento “medio” en una muestra particular. A continuación, se calculó el nivel de expresión relativo del GOI:

$$C_t(\text{GAPDH ajustado}) - C_t(\text{GOI}) = \Delta C_t$$

$$2^{\Delta C_t} = \text{nivel de expresión relativo del GOI}$$

Tal como se muestra en las figuras 3 a 11 y en la Tabla II, los datos actuales de los presentes inventores muestran que, en una diversidad de cánceres, algunos, aunque no todos, los tumores muestran un nivel de expresión de telomerasa (TERT) incrementado respecto al de las células normales. De manera similar, algunos tumores, aunque no todos, muestran un incremento de la expresión de SENP1. La utilización de tanto SENP1 como TERT en combinación como marcadores moleculares de cáncer permite identificar un número de muestras de tejido tumoral como positivas para cáncer que es mayor que el obtenido mediante la utilización de cualquiera de los dos marcadores de manera individual. De esta manera, un ensayo molecular en el que la regulación positiva de cualquiera de los marcadores se puntuase como positiva para cáncer mostraría una sensibilidad incrementada para la detección de cáncer. Esta sensibilidad incrementada supondría, no inesperadamente, un coste de una especificidad en cierta medida menor (es decir, se identificarían como presentando cáncer un número incrementado de sujetos que realmente no presentan cáncer). Para la utilización de un ensayo en un contexto diagnóstico dado, se utilizarían valores estandarizados para los resultados positivos y negativos que maximizarían los resultados correctos, maximizando de esta manera la sensibilidad y la especificidad. En los ejemplos mostrados, se seleccionaron los valores umbral que, para cada marcador individual, proporcionasen una especificidad de aproximadamente 80%. A menos que se muestre lo contrario, el umbral de detección de TERT es cero.

La Tabla III proporciona un resumen del comportamiento de la telomerasa y SENP1 como marcadores individuales o como marcadores en combinación. La sensibilidad es el número de muestras positivas para cáncer de un tipo de tejido dado que se denominan positivas para cáncer, dividido por el número total de muestras positivas para cáncer de ese tipo de tejido. La especificidad es el número de muestras negativas para cáncer (o normales) de un tipo de tejido dado que se denominan negativas para cáncer, dividido por el número total de muestras negativas para cáncer de ese tipo de tejido. La “exactitud” de un ensayo dado se define como la suma de su sensibilidad y especificidad.

Tabla III

Tipo de cáncer	Telomerasa			SENP1			Combinados		
	Sensi- bilidad	Especi- ficidad	Exac- titud	Sensi- bilidad	Especi- ficidad	Exac- titud	Sensi- bilidad	Especi- ficidad	Exac- titud
Vejiga	3/4 75%	7/8 87%	162%	2/4 50%	8/8 100%	150%	4/4 100%	7/8 87%	187%
Mama	7/11 63%	7/7 100%	163%	1/11 9%	6/7 85%	94%	8/11 72%	6/7 85%	114%
Colon	9/54 16%	14/17 82%	98%	14/54 26%	14/17	108%	21/54 38%	13/17 76%	114%
Riñón	0/7 0%	5/5 100%	100%	4/7 57%	5/5 100%	157%	4/7 57%	5/5 100%	157%
Pulmón	3/14 21%	20/21 95%	116%	5/14 36%	17/21 80%	116%	7/14 50%	16/21 76%	126%
Ovario	0/3 0%	4/5 80%	80%	1/3 33%	4/5 80%	113%	1/3 33%	3/5 60%	93%
Páncreas	1/6 16%	1/1 100%	116%	3/6 50%	1/1 100%	150%	4/6 66%	1/1 100%	166%
Páncreas (2° conjunto)	2/9 22%	10/10 100%	122%	4/9 44%	9/10 90%	134%	5/9 56%	9/10 90%	146%
Páncreas (metastásico)	5/6 83%	100%	183%	1/6 17%	90%	107%	5/6 83%	90%	173%
Intestino delgado	0/2 0%	7/8 87%	87%	2/2 100%	7/8 87%	187%	2/2 100%	7/8 87%	187%
TODOS LOS CÁNCERES	30/116 26%	75/82 91%	117%	36/116 31%	71/82 87%	118%	59/116 51%	67/82 82%	133%

Lista de referencias

- Agresti, A.**, *Categorical Data Analysis*, pp. 228-230, 2002
- 5 **Akerstrom et al.**, *J. Immunol.* 135 (1985) 2589-2542
- Alderton et al.**, *Anal. Biochem.* 201 (1992) 166-169
- Altschul et al.**, *J. Mol. Biol.* 215 (1990) 403-410
- 10 **Altschul et al.**, *Nuc. Acids Res.* 25 (1977) 3389-3402
- Angelopoulou et al.**, *Anticancer Res.* 23 (2003) 4821-4829
- 15 **Arnold et al.**, *Clin. Chem.* 35 (1989) 1588-1594
- Asai** (ed.), *Methods in Cell Biology: Antibodies in Cell Biology*, Vol. 37, 1993
- Ausubel et al.** (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, 2002
- 20 **Ausubel et al.**, *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995 Supplement
- Bacchetti, S.** and **Counter, C.M.** *Int. J. Oncology* 7 (1995) 423-432
- 25 **Bailey et al.**, *J Biol Chem.* 279 (2004) 692-703
- Bates et al.**, *Mol. Plant Pathol.* 2 (2001) 275-280
- Baum C&EN**, Jan 18, page 33 (1993)
- 30 **Bayer, P., et al.**, *J Mol Biol.* 280 (1998) 275-286
- BoADNr, A.G., et al.**, *Science* 279 (1998) 349-352
- 35 **Bryan, T.M.**, *Hum Mol Genet* 6 (1997) 921-926
- Bryan, T.M.**, *Nature Medicine* 3 (1997) 1271-1274
- Campbell et al.**, *J. Org. Chem.* 59 (1994) 658
- 40 **Capaldi et al.**, *Nucleic. Acids Res.*, 28 (2000) 21 e
- Chen et al.**, *Biotechniques* 35 (2003) 158-162
- 45 **Chen et al.**, *J. Amer. Chem. Soc.* 116 (1994) 2661
- Cho et al.**, *Science* 261 (1993) 1303
- Cole et al.**, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, pp. 77-96, 1985
- 50 **Coligan**, *Current Protocols in Immunology*, 1991
- Collins, K.**, *Curr. Opin Cell Biol.* 12 (2000) 378-383
- 55 **Compton**, *Nature* 350 (1991) 91-92
- Cong, Y.S., et al.**, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66 (2002) 407-425
- De Lange, T.**, *Science* 279 (1998) 334-335
- 60 **DeGraves, et al.**, *Biotechniques* 34 (2003) 106-110, 112-115
- Deiman B. et al.**, *Mol Biotechnol.* 20 (2002) 163-179
- 65 **DeVita, V.T., et al.** (eds.), *Cancer: Principles and Practice*, 1997
- Dunham, M.A. et al.**, *Nature Genetics* 26 (2000) 447-450

- Eagle et al.**, *J. Exp. Med.* 131 (1970) 836-879
- Folkman**, Angiogenesis and Cancer, *Sem Cancer Biol.* I, 1992
- 5 **Freshney** *Anticancer Res.* 5 (1985) 111-130
- Freshney**, *Culture of Animal Cells a Manual of Basic Technique*, 3rd ed., 1994
- Furka**, *Int. J. Pept. Prot. Res.* 37 (1991) 487-493
- 10 **Gerber**, P.R. and **K. Muller**, *J Comput Aided Mol Des* 9 (1995) 251-268
- Gibson et al.**, *Genome Research* 6 (1996) 995-1001
- 15 **Goding**, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 2nd ed., 1986
- Gong et al.**, *J Biol Chem.* 275 (2000) 3355-3359
- Gong**, L., et al., *FEBS Lett* 448 (1999) 185-189
- 20 **Greiden et al.**, *Nature* 337 (1989) 331
- Guilleret, I. et al.**, *Carcinogenesis* 23 (2002) 2025-2030
- 25 **Gullino**, Angiogenesis, tumor vascularization, and potential interference with tumor growth. in *Biological Responses in Cancer*, Mihich (ed.) pp. 178-184, 1985
- Hagihara et al.**, *J. Amer. Chem. Soc.* 114 (1992) 6568
- 30 **Hanahan** and **Weinberg**, *Cell* 100 (2000) 57-70
- Harlow & Lane**, *Antibodies, A Laboratory Manual*, 1988
- Hatch et al.**, *Genet. Anal.* 15 (1999) 35-40
- 35 **Henikoff** and **Henikoff**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1989) 10915
- Hirschmann et al.**, *J. Amer. Chem. Soc.* 114 (1992) 9217-9218
- 40 **Hiyama et al.**, *Cancer Lett.* 194 (2003) 221-233
- Hobbs et al.**, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 6909-6913
- Holland et al.**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991) 7276-7280
- 45 **Houghton et al.**, *Nature* 354 (1991) 84-88
- Huse et al.**, *Science* 246 (1989) 1275-1281
- 50 **Innis et al.** (eds.), *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*, 1990
- Iqbal et al.**, *Mol. Cell Probes* 13 (1999) 315-320
- Jakobi et al.**, *Anal. Biochem.* 175 (1988) 196-201
- 55 **Johnson**, E.S., et al., *Embo J* 16 (1997) 5509-5519
- Johnston**, S.C., et al., *Embo J.* 18 (1999) 3877-3887
- 60 **Karlin** and **Altschul**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 5873-5787
- Kievits et al.**, *J. Virol. Methods* 35 (1991) 273-286
- Kim**, N.W. et al. *Science* 266 (1994) 2011-2015
- 65 **Klostermeier** and **Millar**, *Biopolymers* 61 (2002) 159-179
- Kohler** and **Milstein**, *Nature* 256 (1975) 495-497

ES 2 345 720 T3

Kozbor et al., *Immunology Today* 4 (1983) 72

Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual*, 1990

Kronval et al., *J. Immunol.* 111 (1973) 1401-1406

Larrick, J. (ed.), *The PCR Technique: Quantitative PCR*, 1997

Lee et al., *Nucleic Acids Res.* 21 (1993) 3761-3766

Li, S.J. and M. **Hochstrasser**, *Nature* 398 (1999) 246-251

Liang et al., *Science*, 274 (1996) 1520-1522

Lipinski et al. *Adv Drug Delivery Res* 23 (1997) 3-25

Lisby, *Mol. Biotechnol.* 12 (1999) 75-99

Little et al., *Clin. Chem.* 45 (1999) 777-784

Lizardi et al., *Bio/Technology* 6 (1988) 1197

Maggio (ed.), *Enzyme Immunoassay*, 1980

Marko et al., *Anal. Biochem.* 121 (1982) 382-387

Marks et al., *Biotechnology* 10 (1992) 779-783

McCafferty et al., *Nature* 348 (1990) 552-554

McEachern, M.J., et al. *Annu. Rev. Genet.* 34 (2000) 331-358

Mehle, C., et al., *Oncogene* 13 (1996) 161-166

Melissourgos et al., *Urology* 62 (2003) 362-367

Miller et al., *J. Clin. Microbiol.* 32 (1994) 393-397

Mossessova, E. and C.D. **Lima**, *Mol Cell* 5 (2000) 865-876

Muller, S., et al., *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 (2001) 202-210

Needleman and **Wunsch**, *J. Mol. Biol.* 48 (1970) 443

Nilsen et al., *J. Theoretical Biology* 187 (1997) 273-284

Paul (ed.), *Fundamental Immunology*, 3rd ed., 1993

PCT/GB91/00212

PCT/US96/10287

Pearson and **Lipman**, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 2444 **Phyffer**, et al., *J. Clin. Microbiol.* 34 (1996) 834-841

Piatyszek M. A. et al., *Meth. Cell Sci.* 17 (1995) 1-15

Pickart, C.M. and I.A. **Rose**, *J Biol Chem* 261 (1986) 10210-10217

Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., 1985

Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3rd ed., 2001

Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Vols. 1-3, *Cold Spring Harbor Press*, New York, 1989

Scheel, C. and **Poremba**, C. *Virchows Arch* 440 (2002) 573-582

ES 2 345 720 T3

Schroder, E., *et al.*, *FEBS Lett*, 315 (1993) 38-42

Shay, J.W. and **Bacchetti**, S., *Eur. J. Cancer*, 33 (1997) 787-791

5 **Shippen-Lentz** *et al.*, *Science* 247 (1990) 546

Smith and **Waterman**, *Adv. Appl. Math.* 2 (1970) 482c

Stites and **Terr** (eds.), *Basic and Clinical Immunology*, 7th ed., 1991

10 **Strickland & Beers**, *J. Biol. Chem.* 251 (1976) 5694-5702

Taton *et al.*, *Science* 289 (2000) 1757-1760

15 **Temin**, *J. Natl. Cancer Inst.* 37 (1966) 167-175

Thellin, O. *et al.*, *J. Biotechnol.* 75 (1999) 291

Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Probes*, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays", 1993

20 **Tsutsui**, T. *et al.*, *Carcinogenesis* 24 (2003) 953-965

Tyagi and **Kramer**, *Nature Biotech.* 14 (1996) 303-309

25 U.S. Patent Application No. 07/695,072

Unkless *et al.*, *J. Biol. Chem.* 249 (1974) 4295-4305

30 US 2002/0012969

US 2002/0025518

US 4.366.241

35 US 4.376.110

US 4.517.288

40 US 4.683.195

US 4.683.202

US 4.767.700

45 US 4.837.168

US 4.851.331

50 US 4.889.818

US 4.914.210

US 4.946.778

55 US 4.948.882

US 4.994.373

60 US 5.010.175

US 5.079.352

US 5.102.784

65 US 5.118.605

US 5.118.802

ES 2 345 720 T3

	US 5.119.801
	US 5.135.717
5	US 5.155.018
	US 5.210.015
	US 5.232.829
10	US 5.234.809
	US 5.288.514
15	US 5.294.534
	US 5.312.728
	US 5.352.600
20	US 5.405.774
	US 5.424.414
25	US 5.437.977
	US 5.464.746.
	US 5.466.591
30	US 5.487.972
	US 5.491.063
35	US 5.506.337
	US 5.514.546
	US 5.519.134
40	US 5.525.462
	US 5.525.465
45	US 5.525.735
	US 5.539.083
	US 5.547.861
50	US 5.549.974
	US 5.556.959
55	US 5.569.588
	US 5.571.673
	US 5.593.853
60	US 5.595.890
	US 5.597.696
65	US 5.618.711
	US 5.641.633

ES 2 345 720 T3

	US 5.648.245
	US 5.674.738
5	US 5.679.510
	US 5.679.785
	US 5.683.872
10	US 5.683.875
	US 5.707.813
15	US 5.710.028
	US 5.714.320
	US 5.728.525
20	US 5.750.343
	US 5.789.562
25	US 5.792.614
	US 5.795.718
	US 5.795.762
30	US 5.800.989
	US 5.804.375
35	US 5.808.036
	US 5.808.044
	US 5.814.447
40	US 5.837.453
	US 5.844.106
45	US 5.846.723
	US 5.846.726
	US 5.853.990
50	US 5.856.092
	US 5.866.336
55	US 5.876.924
	US 5.880.287
	US 5.882.867
60	US 5.888.723
	US 5.888.739
65	US 5.919.630
	US 5.935.791

ES 2 345 720 T3

	US 5.945.283
	US 5.955.589
5	US 5.958.700
	US 5.972.602
	US 5.981.176
10	US 5.990.303
	US 5.994.063
15	US 6.001.611
	US 6.022.686
	US 6.033.854
20	US 6.054.279
	US 6.080.068
25	US 6.110.677
	US 6.121.001
	US 6.124.090
30	US 6.130.047
	US 6.140.055
35	US 6.174.998
	US 6.177.249
	US 6.180.349
40	US 6.210.884
	US 6.214.979
45	US 6.221.603
	US 6.221.604
	US 6.245.514
50	US 6.261.779
	US 6.261.784
55	US 6.268.128
	US 6.294.338
	US 6.312.906
60	US 6.320.005
	US 6.326.145
65	US 6.335.166
	US 6.344.329

ES 2 345 720 T3

	US 6.348.596
	US 6.350.580
5	US 6.352.827
	US 6.361.944
	US 6.365.724
10	US 6.368.803
	US 6.379.888
15	US 6.383.393
	US 6.383.756
	US 6.391.554
20	US 6.399.303
	US 6.399.392
25	US 6.406.297
	US 6.417.340
	US 6.440.707
30	US 6.495.324
	US 6.506.564
35	US 6.528.254
	US 6.528.632
	US 6.551.774
40	US 6.582.964
	US 6.596.527
45	US 6.607.898
	Vaughn et al. , <i>Nature Biotechnology</i> , 14 (1996) 309-314
	Vogelstein et al. , <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 76 (1979) 615-619
50	Vuorinen, et al. , <i>J. Clin. Microbiol.</i> 33 (1995) 1856-1859
	Walker, et al. <i>Nucleic Acids Res.</i> 20 (1992) 1691-1696
55	Walker , <i>PCR Methods Appl</i> 3 (1993) 1-6
	Wang et al. , <i>Electroanalysis</i> 10 (1998) 553-556
	Wang et al. , <i>J. Am. Chem. Soc.</i> 120 (1998) 8281-8282
60	Ward et al. , <i>Nature</i> 341 (198) 544-546
	Warrington, J.A. et al. , <i>Physiol. Genomics</i> 2 (2000) 143
65	Wege et al. , <i>Nuc. Acids Res.</i> 31 (2003) e3
	Whur et al. , <i>Br. J. Cancer</i> 42 (1980) 305-312

ES 2 345 720 T3

Wilson *et al.*, Harrison's Principles of Internal Medicine, 12th Edition, *McGraw-Hill*, Inc., 1991

WO 01/37291

5 WO 91/19735

WO 92/00091

10 WO 93/20242

WO 95/35390

Woodring *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 23 (1995) 3794-3795

15 **Wu** and **Brand**, *Anal. Biochem.* 218 (1994) 1-13

Yan, P. *et al.* *Cancer Res.* 59 (1999) 3166-3170

20 **Yeager**, T.R., *et al.*, *Cancer Res.* 59 (1999) 4175-4179

Yeh, E.T., *et al.*, *Gene* 248 (2000) 1-14

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar la expresión de SENP1 en una muestra biológica, comprendiendo el método:

determinar la cantidad de SENP1 y de TERT o TERC en una muestra biológica procedente de un individuo que presenta, o que se sospecha que presenta, cáncer de vejiga.

2. Método según la reivindicación 1, en el que el método comprende además registrar un diagnóstico de cáncer de vejiga.

3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la cantidad de SENP1 se determina mediante la detección de un polinucleótido codificante de SENP1 en la muestra.

4. Método según las reivindicaciones 1 a 3, en el que la etapa de detección comprende amplificar el polinucleótido en una reacción de amplificación.

5. Método según la reivindicación 4, en el que la reacción de amplificación comprende por lo menos dos oligonucleótidos diferentes que comprenden una secuencia por lo menos 90% idéntica a por lo menos 10 nucleótidos contiguos de secuencia SEC ID nº 1, o un complemento de la misma, de manera que, durante la reacción de amplificación, los oligonucleótidos ceban la amplificación de por lo menos un fragmento de secuencia SEC ID nº 1.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 y/o 5, en el que el producto de amplificación de la reacción de amplificación se detecta en una etapa que comprende hibridar un oligonucleótido detectablemente marcado con el producto.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que la reacción de amplificación comprende un ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que presenta actividad 5' a 3' exonucleasa bajo condiciones que permiten que la polimerasa fragmente el oligonucleótido detectablemente marcado.

8. Método según las reivindicaciones 1 a 7, en el que la cantidad de SENP1 se estima mediante la detección de un ARN codificante de SENP1 en la muestra.

9. Método según las reivindicaciones 1 a 8, en el que el método comprende además comparar la cantidad de SENP1 y TERT o TERC en la muestra con un estándar de SENP1 y un estándar de TERT o TERC, respectivamente, en el que el estándar de SENP1 representa las cantidades de SENP1 en células normales y TERT o TERC representa las cantidades de TERT o TERC en células normales.

10. Método según las reivindicaciones 1 a 9, en el que la muestra biológica es orina.

11. Kit para detectar una célula de cáncer de vejiga en una muestra biológica procedente de un individuo, comprendiendo el kit:

a) por lo menos un oligonucleótido que comprende una secuencia por lo menos 90% idéntica a por lo menos 10 nucleótidos contiguos de secuencia SEC ID nº 1, o un complemento de la misma, de manera que, al someter el oligonucleótido y un polinucleótido que comprende la secuencia SEC ID nº 1 a una reacción de amplificación, el oligonucleótido ceba la amplificación de por lo menos un fragmento de secuencia SEC ID nº 1,

b) un oligonucleótido detectablemente marcado que comprende una secuencia por lo menos 90% idéntica a por lo menos 10 nucleótidos contiguos de secuencia SEC ID nº 1, o un complemento de la misma,

c) por lo menos un oligonucleótido que comprende una secuencia por lo menos 90% idéntica a por lo menos 10 nucleótidos contiguos de:

- i) ARN de telomerasa humana (TERC),
- ii) ARNm de proteína transcriptasa inversa de la telomerasa humana (TERT),
- iii) un complemento de TERC, o
- iv) un complemento de TERT,

de manera que, al someter el oligonucleótido y el ARNm de TERC o de TERT a una reacción de amplificación, el oligonucleótido ceba la amplificación de por lo menos un fragmento de ARNm de TERC o TERT, y

d) un oligonucleótido detectablemente marcado que comprende una secuencia por lo menos 90% idéntica a por lo menos 10 nucleótidos contiguos de:

ES 2 345 720 T3

- i) ARN de telomerasa humana (TERC),
- ii) ARNm de proteína transcriptasa inversa de la telomerasa humana (TERT),
- 5 iii) un complemento de TERC, o
- iv) un complemento de TERT.

12. Mezcla de reacción que comprende:

a) por lo menos un oligonucleótido que comprende una secuencia por lo menos 90% idéntica a por lo menos 10 nucleótidos contiguos de secuencia SEC ID nº 1, o un complemento de la misma, de manera que, al someter el oligonucleótido y un polinucleótido que comprende la secuencia SEC ID nº 1 a una reacción de amplificación, el
15 oligonucleótido ceba la amplificación de por lo menos un fragmento de secuencia SEC ID nº 1,

b) un oligonucleótido detectablemente marcado que comprende una secuencia por lo menos 90% idéntica a por lo menos 10 nucleótidos contiguos de secuencia SEC ID nº 1, o un complemento de la misma,

c) por lo menos un oligonucleótido que comprende una secuencia por lo menos 90% idéntica a por lo menos 10 nucleótidos contiguos de:

- i) ARN de telomerasa humana (TERC),
- 25 ii) ARNm de proteína transcriptasa inversa de la telomerasa humana (TERT),
- iii) un complemento de TERC, o
- iv) un complemento de TERT,

de manera que, al someter el oligonucleótido y ARNm de TERC o de TERT a una reacción de amplificación, el oligonucleótido ceba la amplificación de por lo menos un fragmento de ARNm de TERC o de TERT, y

d) un oligonucleótido detectablemente marcado que comprende una secuencia por lo menos 90% idéntica a por lo menos 10 nucleótidos contiguos de:

- i) ARN de telomerasa humana (TERC),
- 40 ii) ARNm de proteína transcriptasa inversa de la telomerasa humana (TERT),
- iii) un complemento de TERC, o
- iv) un complemento de TERT.

Figura 1

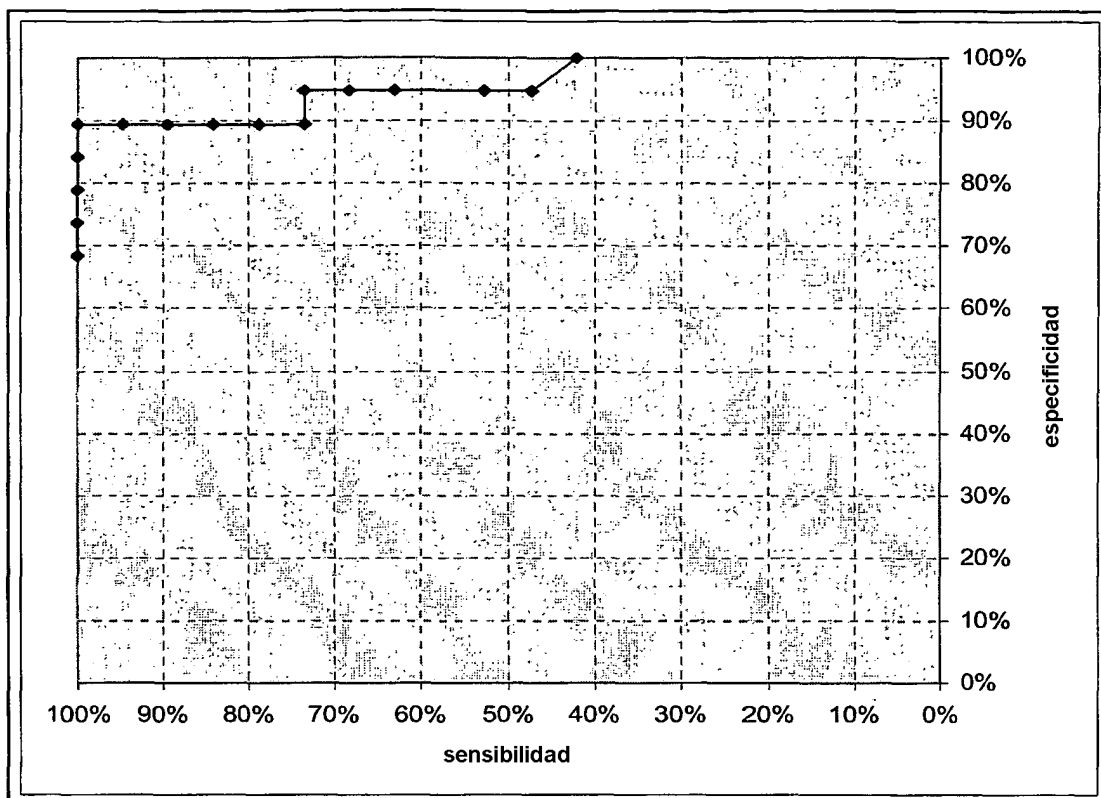


Figura 2

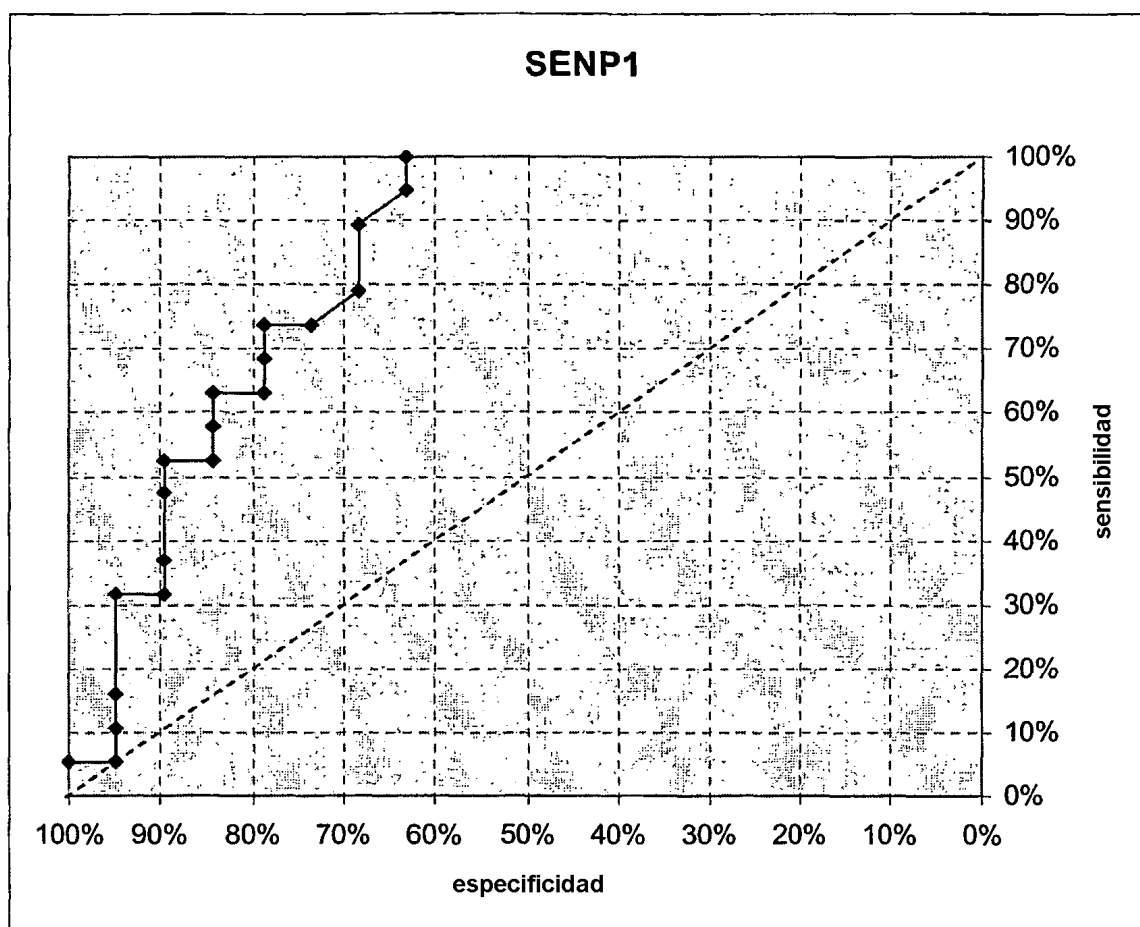


Figura 3A

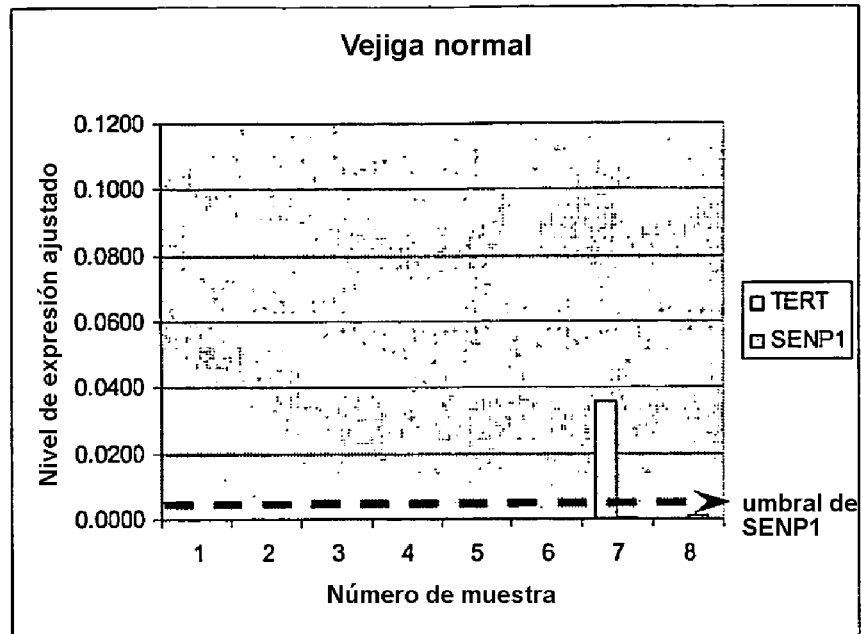
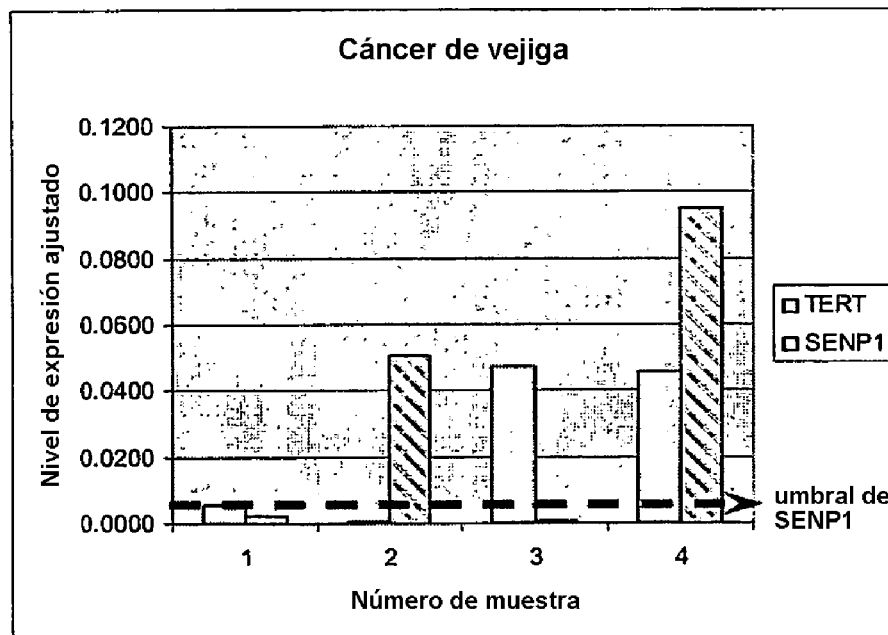


Figura 3B



ES 2 345 720 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Roche Diagnostics GmbH F. Hoffmann-La Roche AG

<120> SENP1 como marcador de cáncer

<130> 22347WO

<150> US 60/569,220

<151> 2004-05-06

<150> US 60/599,318

<151> 2004-08-05

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 3.2

<210> 1

<211> 1932

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> proteasa 1 específica de sentrina/SUMO (SENP1)

<400> 1

```

atggatgata ttgctgatag gatgaggatg gatgctggag aagtgacttt agtgaaccac 60
aactccgtat tcaaaaccca cctcctgcca caaacagggt ttccagagga ccagctttcg 120
ctttctgacc agcagathtt atcttccagg caaggacatt tggaccgac ttttacatgt 180
tccacaagaa gtgcagctta taatccaagc tattactcag ataatccttc ctgagacagt 240
tttcttggtc caggcgatth aagaaccttt ggccagagtg caaatggcca atggagaaat 300
tctaccccat cgtcaagctc atctttacaa aaatcaagaa acagccgaag tctttacctc 360
gaaacccgaa agacctcaag tggattatca aacagttttg cgggaaagtc aaaccatcac 420
tgccatgtat ctgcatatga aaaatctttt cctattaaac ctgttccaag tccatcttgg 480
agtggttcat gtcgtcgaag tcttttgagc cccaagaaaa ctgagaggcg acatgttagt 540
acagcagaag agacagttca agaagaagaa agagagattt acagacagct gctacagatg 600
gtcacaggga aacagtttac tatagccaaa cccaccacac attttccttt acacctgtct 660
cgatgtctta gttccagtaa aaatactttg aaagactcac tgtttaaaaa tggaaactct 720
tgtgcatctc agatcattgg ctctgatact tcatcatctg gatctgccag cattttaact 780
aaccagggaac agctgtccca cagtgtatat tccctatctt cttatacccc agatgttgca 840
tttggatcca aagattctgg tactcttcat catccccatc atcaccactc tgttccacat 900
cagccagata acttagcagc ttcaaataca caatctgaag gatcagactc tgtgatttta 960
ctgaaagtga aagattccca gactccaact cccagttcta ctttcttcca ggcagagctg 1020
tggatcaaag aattaactag tgtttatgat tctcgagcac gagaaagatt gcgccagatt 1080
gaagaacaga aggcattggc ctacagctt caaaaccaga gattgcagga gcgggaacat 1140
tcagtacatg attcagtaga actacatctt cgtgtacctc ttgaaaagga gattcctgtt 1200
actgttgtcc aagaaacaca aaaaaaaggt cataaattaa ctgatagtga agatgaattt 1260
cctgaaatta cagaggaaat ggagaaagaa ataaagaatg tatttcgtaa tgggaatcag 1320
gatgaagttc tcagtgaagc atttcgcctg accattacac gcaaagatat tcaaactcta 1380
aaccatctga attggctcaa tgatgagatc atcaatttct acatgaatat gctgatggag 1440
cgaagtaaag agaagggttt gccagtggtg catgcattta ataccttttt cttcactaaa 1500
ttaaaaacgg ctggttatca ggcagtgaag cggtggacaa agaaagtaga tgtattttct 1560
gttgacatc ttttggtgcc cattcacctg ggagtacact ggtgtctagc tgtgtgggac 1620
tttagaaaga agaattattc ctattacgac tccatgggtg ggataaacia tgaagcctgc 1680
agaatactct tgcaatacct aaagcaagaa agcattgaca agaaaaggaa agagtttgac 1740

```

```

accaatggct ggcagctttt cagcaagaaa agccagattc ctgagcagat gaatggaagt 1800
gactgtggga tgtttgcctg caaatatgct gactgtatta ccaaagacag accaatcaac 1860
ttcacacagc aacacatgcc atacttcctg aagcggatgg tctgggagat cctccaccga 1920
aaactcttgt ga
1932

```

<210> 2

<211> 643

ES 2 345 720 T3

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

5 <223> proteasa 1 específica de sentrina/SUMO (SENPI)

<400> 2

```

10      Met Asp Asp Ile Ala Asp Arg Met Arg Met Asp Ala Gly Glu Val Thr
        1          5          10          15
      Leu Val Asn His Asn Ser Val Phe Lys Thr His Leu Leu Pro Gln Thr
15              20          25          30
      Gly Phe Pro Glu Asp Gln Leu Ser Leu Ser Asp Gln Gln Ile Leu Ser
              35          40          45
20      Ser Arg Gln Gly His Leu Asp Arg Ser Phe Thr Cys Ser Thr Arg Ser
        50          55          60
      Ala Ala Tyr Asn Pro Ser Tyr Tyr Ser Asp Asn Pro Ser Ser Asp Ser
        65          70          75          80
25      Phe Leu Gly Ser Gly Asp Leu Arg Thr Phe Gly Gln Ser Ala Asn Gly
              85          90          95
30      Gln Trp Arg Asn Ser Thr Pro Ser Ser Ser Ser Ser Leu Gln Lys Ser
              100          105          110
      Arg Asn Ser Arg Ser Leu Tyr Leu Glu Thr Arg Lys Thr Ser Ser Gly
35              115          120          125
      Leu Ser Asn Ser Phe Ala Gly Lys Ser Asn His His Cys His Val Ser
        130          135          140
40      Ala Tyr Glu Lys Ser Phe Pro Ile Lys Pro Val Pro Ser Pro Ser Trp
        145          150          155          160
      Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ser Leu Leu Ser Pro Lys Lys Thr Gln Arg
45              165          170          175
      Arg His Val Ser Thr Ala Glu Glu Thr Val Gln Glu Glu Glu Arg Glu
        180          185          190
50      Ile Tyr Arg Gln Leu Leu Gln Met Val Thr Gly Lys Gln Phe Thr Ile
        195          200          205
      Ala Lys Pro Thr Thr His Phe Pro Leu His Leu Ser Arg Cys Leu Ser
        210          215          220

```


ES 2 345 720 T3

	Ser	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Lys	Asp	Ser	Leu	Phe	Lys	Asn	Gly	Asn	Ser	
	225					230					235					240	
5	Cys	Ala	Ser	Gln	Ile	Ile	Gly	Ser	Asp	Thr	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Ala	
					245					250					255		
	Ser	Ile	Leu	Thr	Asn	Gln	Glu	Gln	Leu	Ser	His	Ser	Val	Tyr	Ser	Leu	
10				260					265					270			
	Ser	Ser	Tyr	Thr	Pro	Asp	Val	Ala	Phe	Gly	Ser	Lys	Asp	Ser	Gly	Thr	
			275					280					285				
15	Leu	His	His	Pro	His	His	His	His	Ser	Val	Pro	His	Gln	Pro	Asp	Asn	
	290						295					300					
	Leu	Ala	Ala	Ser	Asn	Thr	Gln	Ser	Glu	Gly	Ser	Asp	Ser	Val	Ile	Leu	
20	305					310					315				320		
	Leu	Lys	Val	Lys	Asp	Ser	Gln	Thr	Pro	Thr	Pro	Ser	Ser	Thr	Phe	Phe	
					325					330					335		
25	Gln	Ala	Glu	Leu	Trp	Ile	Lys	Glu	Leu	Thr	Ser	Val	Tyr	Asp	Ser	Arg	
				340					345					350			
	Ala	Arg	Glu	Arg	Leu	Arg	Gln	Ile	Glu	Glu	Gln	Lys	Ala	Leu	Ala	Leu	
30			355					360					365				
	Gln	Leu	Gln	Asn	Gln	Arg	Leu	Gln	Glu	Arg	Glu	His	Ser	Val	His	Asp	
	370						375					380					
35	Ser	Val	Glu	Leu	His	Leu	Arg	Val	Pro	Leu	Glu	Lys	Glu	Ile	Pro	Val	
	385					390					395				400		
	Thr	Val	Val	Gln	Glu	Thr	Gln	Lys	Lys	Gly	His	Lys	Leu	Thr	Asp	Ser	
					405					410					415		
40	Glu	Asp	Glu	Phe	Pro	Glu	Ile	Thr	Glu	Glu	Met	Glu	Lys	Glu	Ile	Lys	
				420					425					430			
	Asn	Val	Phe	Arg	Asn	Gly	Asn	Gln	Asp	Glu	Val	Leu	Ser	Glu	Ala	Phe	
45			435					440					445				
	Arg	Leu	Thr	Ile	Thr	Arg	Lys	Asp	Ile	Gln	Thr	Leu	Asn	His	Leu	Asn	
	450						455					460					
50	Trp	Leu	Asn	Asp	Glu	Ile	Ile	Asn	Phe	Tyr	Met	Asn	Met	Leu	Met	Glu	
	465					470					475					480	
	Arg	Ser	Lys	Glu	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Val	His	Ala	Phe	Asn	Thr	Phe	
55					485					490					495		
	Phe	Phe	Thr	Lys	Leu	Lys	Thr	Ala	Gly	Tyr	Gln	Ala	Val	Lys	Arg	Trp	
				500					505					510			
60	Thr	Lys	Lys	Val	Asp	Val	Phe	Ser	Val	Asp	Ile	Leu	Leu	Val	Pro	Ile	
				515				520					525				

ES 2 345 720 T3

	His	Leu	Gly	Val	His	Trp	Cys	Leu	Ala	Val	Val	Asp	Phe	Arg	Lys	Lys
	530						535					540				
5	Asn	Ile	Thr	Tyr	Tyr	Asp	Ser	Met	Gly	Gly	Ile	Asn	Asn	Glu	Ala	Cys
	545					550					555					560
	Arg	Ile	Leu	Leu	Gln	Tyr	Leu	Lys	Gln	Glu	Ser	Ile	Asp	Lys	Lys	Arg
10					565					570					575	
	Lys	Glu	Phe	Asp	Thr	Asn	Gly	Trp	Gln	Leu	Phe	Ser	Lys	Lys	Ser	Gln
				580					585					590		
15	Ile	Pro	Gln	Gln	Met	Asn	Gly	Ser	Asp	Cys	Gly	Met	Phe	Ala	Cys	Lys
			595					600					605			
	Tyr	Ala	Asp	Cys	Ile	Thr	Lys	Asp	Arg	Pro	Ile	Asn	Phe	Thr	Gln	Gln
20		610					615					620				
	His	Met	Pro	Tyr	Phe	Arg	Lys	Arg	Met	Val	Trp	Glu	Ile	Leu	His	Arg
	625					630					635					640
25	Lys	Leu	Leu													
	<210> 3															
	<211> 1132															
30	<212> PRT															
	<213> <i>Homo sapiens</i>															
	<220>															
35	<223> transcriptasa inversa de la telomerasa humana (TERT)															
	<400> 3															
	Met	Pro	Arg	Ala	Pro	Arg	Cys	Arg	Ala	Val	Arg	Ser	Leu	Leu	Arg	Ser
40	1				5					10					15	
	His	Tyr	Arg	Glu	Val	Leu	Pro	Leu	Ala	Thr	Phe	Val	Arg	Arg	Leu	Gly
				20					25					30		
45	Pro	Gln	Gly	Trp	Arg	Leu	Val	Gln	Arg	Gly	Asp	Pro	Ala	Ala	Phe	Arg
			35					40					45			
	Ala	Leu	Val	Ala	Gln	Cys	Leu	Val	Cys	Val	Pro	Trp	Asp	Ala	Arg	Pro
50		50					55					60				
	Pro	Pro	Ala	Ala	Pro	Ser	Phe	Arg	Gln	Val	Ser	Cys	Leu	Lys	Glu	Leu
	65					70					75					80
55	Val	Ala	Arg	Val	Leu	Gln	Arg	Leu	Cys	Glu	Arg	Gly	Ala	Lys	Asn	Val
					85					90					95	
	Leu	Ala	Phe	Gly	Phe	Ala	Leu	Leu	Asp	Gly	Ala	Arg	Gly	Gly	Pro	Pro
60				100					105					110		
	Glu	Ala	Phe	Thr	Thr	Ser	Val	Arg	Ser	Tyr	Leu	Pro	Asn	Thr	Val	Thr
			115					120					125			

ES 2 345 720 T3

	Asp	Ala	Leu	Arg	Gly	Ser	Gly	Ala	Trp	Gly	Leu	Leu	Leu	Arg	Arg	Val	
	130						135					140					
5	Gly	Asp	Asp	Val	Leu	Val	His	Leu	Leu	Ala	Arg	Cys	Ala	Leu	Phe	Val	
	145					150					155					160	
	Leu	Val	Ala	Pro	Ser	Cys	Ala	Tyr	Gln	Val	Cys	Gly	Pro	Pro	Leu	Tyr	
10					165					170					175		
	Gln	Leu	Gly	Ala	Ala	Thr	Gln	Ala	Arg	Pro	Pro	Pro	His	Ala	Ser	Gly	
				180					185					190			
15	Pro	Arg	Arg	Arg	Leu	Gly	Cys	Glu	Arg	Ala	Trp	Asn	His	Ser	Val	Arg	
			195					200					205				
	Glu	Ala	Gly	Val	Pro	Leu	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Gly	Ala	Arg	Arg	Arg	
20		210					215					220					
	Gly	Gly	Ser	Ala	Ser	Arg	Ser	Leu	Pro	Leu	Pro	Lys	Arg	Pro	Arg	Arg	
	225					230					235					240	
25	Gly	Ala	Ala	Pro	Glu	Pro	Glu	Arg	Thr	Pro	Val	Gly	Gln	Gly	Ser	Trp	
					245					250					255		
	Ala	His	Pro	Gly	Arg	Thr	Arg	Gly	Pro	Ser	Asp	Arg	Gly	Phe	Cys	Val	
				260					265					270			
30	Val	Ser	Pro	Ala	Arg	Pro	Ala	Glu	Glu	Ala	Thr	Ser	Leu	Glu	Gly	Ala	
			275					280					285				
	Leu	Ser	Gly	Thr	Arg	His	Ser	His	Pro	Ser	Val	Gly	Arg	Gln	His	His	
35		290					295					300					
	Ala	Gly	Pro	Pro	Ser	Thr	Ser	Arg	Pro	Pro	Arg	Pro	Trp	Asp	Thr	Pro	
	305					310					315					320	
40	Cys	Pro	Pro	Val	Tyr	Ala	Glu	Thr	Lys	His	Phe	Leu	Tyr	Ser	Ser	Gly	
					325					330					335		
	Asp	Lys	Glu	Gln	Leu	Arg	Pro	Ser	Phe	Leu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Pro	
45				340					345					350			
	Ser	Leu	Thr	Gly	Ala	Arg	Arg	Leu	Val	Glu	Thr	Ile	Phe	Leu	Gly	Ser	
			355					360					365				
50	Arg	Pro	Trp	Met	Pro	Gly	Thr	Pro	Arg	Arg	Leu	Pro	Arg	Leu	Pro	Gln	
		370					375					380					
	Arg	Tyr	Trp	Gln	Met	Arg	Pro	Leu	Phe	Leu	Glu	Leu	Leu	Gly	Asn	His	
55		385				390					395					400	
	Ala	Gln	Cys	Pro	Tyr	Gly	Val	Leu	Leu	Lys	Thr	His	Cys	Pro	Leu	Arg	
					405					410					415		
60	Ala	Ala	Val	Thr	Pro	Ala	Ala	Gly	Val	Cys	Ala	Arg	Glu	Lys	Pro	Gln	
				420					425					430			

65

ES 2 345 720 T3

	Gly	Ser	Val	Ala	Ala	Pro	Glu	Glu	Glu	Asp	Thr	Asp	Pro	Arg	Arg	Leu	
			435					440					445				
5	Val	Gln	Leu	Leu	Arg	Gln	His	Ser	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Tyr	Gly	Phe	
	450						455					460					
	Val	Arg	Ala	Cys	Leu	Arg	Arg	Leu	Val	Pro	Pro	Gly	Leu	Trp	Gly	Ser	
10	465					470				475						480	
	Arg	His	Asn	Glu	Arg	Arg	Phe	Leu	Arg	Asn	Thr	Lys	Lys	Phe	Ile	Ser	
				485						490					495		
15	Leu	Gly	Lys	His	Ala	Lys	Leu	Ser	Leu	Gln	Glu	Leu	Thr	Trp	Lys	Met	
				500					505					510			
	Ser	Val	Arg	Asp	Cys	Ala	Trp	Leu	Arg	Arg	Ser	Pro	Gly	Val	Gly	Cys	
20			515					520					525				
	Val	Pro	Ala	Ala	Glu	His	Arg	Leu	Arg	Glu	Glu	Ile	Leu	Ala	Lys	Phe	
	530						535					540					
25	Leu	His	Trp	Leu	Met	Ser	Val	Tyr	Val	Val	Glu	Leu	Leu	Arg	Ser	Phe	
	545					550					555					560	
	Phe	Tyr	Val	Thr	Glu	Thr	Thr	Phe	Gln	Lys	Asn	Arg	Leu	Phe	Phe	Tyr	
30				565						570					575		
	Arg	Lys	Ser	Val	Trp	Ser	Lys	Leu	Gln	Ser	Ile	Gly	Ile	Arg	Gln	His	
				580					585					590			
35	Leu	Lys	Arg	Val	Gln	Leu	Arg	Glu	Leu	Ser	Glu	Ala	Glu	Val	Arg	Gln	
			595					600					605				
	His	Arg	Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser	Arg	Leu	Arg	Phe	Ile	
40		610					615					620					
	Pro	Lys	Pro	Asp	Gly	Leu	Arg	Pro	Ile	Val	Asn	Met	Asp	Tyr	Val	Val	
	625					630					635					640	
45	Gly	Ala	Arg	Thr	Phe	Arg	Arg	Glu	Lys	Arg	Ala	Glu	Arg	Leu	Thr	Ser	
				645					650						655		
	Arg	Val	Lys	Ala	Leu	Phe	Ser	Val	Leu	Asn	Tyr	Glu	Arg	Ala	Arg	Arg	
				660					665					670			
50	Pro	Gly	Leu	Leu	Gly	Ala	Ser	Val	Leu	Gly	Leu	Asp	Asp	Ile	His	Arg	
			675					680					685				
55	Ala	Trp	Arg	Thr	Phe	Val	Leu	Arg	Val	Arg	Ala	Gln	Asp	Pro	Pro	Pro	
	690						695					700					
	Glu	Leu	Tyr	Phe	Val	Lys	Val	Asp	Val	Thr	Gly	Ala	Tyr	Asp	Thr	Ile	
	705					710					715					720	
60	Pro	Gln	Asp	Arg	Leu	Thr	Glu	Val	Ile	Ala	Ser	Ile	Ile	Lys	Pro	Gln	
					725					730					735		

65

ES 2 345 720 T3

	Asn	Thr	Tyr	Cys	Val	Arg	Arg	Tyr	Ala	Val	Val	Gln	Lys	Ala	Ala	His	
				740					745					750			
5	Gly	His	Val	Arg	Lys	Ala	Phe	Lys	Ser	His	Val	Ser	Thr	Leu	Thr	Asp	
			755					760					765				
10	Leu	Gln	Pro	Tyr	Met	Arg	Gln	Phe	Val	Ala	His	Leu	Gln	Glu	Thr	Ser	
		770					775					780					
	Pro	Leu	Arg	Asp	Ala	Val	Val	Ile	Glu	Gln	Ser	Ser	Ser	Leu	Asn	Glu	
	785					790					795					800	
15	Ala	Ser	Ser	Gly	Leu	Phe	Asp	Val	Phe	Leu	Arg	Phe	Met	Cys	His	His	
					805					810					815		
20	Ala	Val	Arg	Ile	Arg	Gly	Lys	Ser	Tyr	Val	Gln	Cys	Gln	Gly	Ile	Pro	
				820					825					830			
	Gln	Gly	Ser	Ile	Leu	Ser	Thr	Leu	Leu	Cys	Ser	Leu	Cys	Tyr	Gly	Asp	
			835					840					845				
25	Met	Glu	Asn	Lys	Leu	Phe	Ala	Gly	Ile	Arg	Arg	Asp	Gly	Leu	Leu	Leu	
		850					855					860					
30	Arg	Leu	Val	Asp	Asp	Phe	Leu	Leu	Val	Thr	Pro	His	Leu	Thr	His	Ala	
	865					870					875					880	
	Lys	Thr	Phe	Leu	Arg	Thr	Leu	Val	Arg	Gly	Val	Pro	Glu	Tyr	Gly	Cys	
					885					890					895		
35	Val	Val	Asn	Leu	Arg	Lys	Thr	Val	Val	Asn	Phe	Pro	Val	Glu	Asp	Glu	
				900					905					910			
40	Ala	Leu	Gly	Gly	Thr	Ala	Phe	Val	Gln	Met	Pro	Ala	His	Gly	Leu	Phe	
			915					920					925				
	Pro	Trp	Cys	Gly	Leu	Leu	Leu	Asp	Thr	Arg	Thr	Leu	Glu	Val	Gln	Ser	
		930					935					940					
45	Asp	Tyr	Ser	Ser	Tyr	Ala	Arg	Thr	Ser	Ile	Arg	Ala	Ser	Leu	Thr	Phe	
	945					950					955					960	
50	Asn	Arg	Gly	Phe	Lys	Ala	Gly	Arg	Asn	Met	Arg	Arg	Lys	Leu	Phe	Gly	
					965					970					975		
	Val	Leu	Arg	Leu	Lys	Cys	His	Ser	Leu	Phe	Leu	Asp	Leu	Gln	Val	Asn	
				980					985					990			
55	Ser	Leu	Gln	Thr	Val	Cys	Thr	Asn	Ile	Tyr	Lys	Ile	Leu	Leu	Leu	Gln	
			995					1000					1005				
60	Ala	Tyr	Arg	Phe	His	Ala	Cys	Val	Leu	Gln	Leu	Pro	Phe	His	Gln	Gln	
		1010					1015					1020					
	Val	Trp	Lys	Asn	Pro	Thr	Phe	Phe	Leu	Arg	Val	Ile	Ser	Asp	Thr	Ala	
	1025					1030					1035					1040	

ES 2 345 720 T3

Ser Leu Cys Tyr Ser Ile Leu Lys Ala Lys Asn Ala Gly Met Ser Leu
1045 1050 1055

5 Gly Ala Lys Gly Ala Ala Gly Pro Leu Pro Ser Glu Ala Val Gln Trp
1060 1065 1070

10 Leu Cys His Gln Ala Phe Leu Leu Lys Leu Thr Arg His Arg Val Thr
1075 1080 1085

Tyr Val Pro Leu Leu Gly Ser Leu Arg Thr Ala Gln Thr Gln Leu Ser
1090 1095 1100

15 Arg Lys Leu Pro Gly Thr Thr Leu Thr Ala Leu Glu Ala Ala Ala Asn
1105 1110 1115 1120

20 Pro Ala Leu Pro Ser Asp Phe Lys Thr Ile Leu Asp
1125 1130

<210> 4
<211> 4015
25 <212> ADN
<213> *Homo sapiens*
<220>
30 <223> transcriptasa inversa de la telomerasa humana (TERT)
<400> 4

35 gcagcgctgc gtccctgctgc gcacgtggga agccctggcc ccggccaccc ccgcgatgcc 60
gcgcgctccc cgctgccgag ccgtgcgctc cctgctgcgc agccactacc gcgaggtgct 120
gccgctggcc acgttcgtgc ggccgctggg gcccagggc tggcggctgg tgcagcgcg 180
ggaccggcg gctttccgcg cgtgggtggc ccagtgcctg gtgtgcgtgc cctgggacgc 240
acggccgccc ccgcgcgccc cctccttcgc ccaggtgtcc tgcctgaagg agctgggtggc 300
40 ccgagtgtgc cagaggtgtg gcgagcgcg gcgaagaac gtgctggcct tcggcttcgc 360
gctgctggac ggggcccgcg ggggcccccc cgaggccttc accaccagcg tgcgcagcta 420
cctgcccac acggtgaccg acgcactgcg ggggagcggg gcgtgggggc tgctgctgcg 480
ccgcgtgggc gacgacgtgc tgggtcacct gctggcacgc tgcgcgctct ttgtgctggt 540
ggctcccagc tgcgcctacc aggtgtgctg gccgcgctg taccagctcg gcgctgccac 600
45 tcaggcccg ccccgccac acgctagtgg acccgaaagg cgtctgggat gcgaacgggc 660
ctggaaccat agcgtcaggg aggcgggggt cccctgggc ctgccagccc cgggtgcgag 720
gaggcgcggg ggcagtgcga gccgaagtct gccgttgccc aagaggccca ggcgtggcgc 780
tgccctgag ccggagcgga cgcgcgttg gcaggggtcc tgggcccacc cgggcaggac 840
gcgtggaccg agtgaccgtg gtttctgtgt ggtgtcacct gccagaccg ccgaagaagc 900
50 cactctttg gagggtgcgc tctctggcac gcgccactcc caccatccg tgggcccga 960
gcaccacgc ggcccccat ccacatcgcg gccaccacgt ccctgggaca cgccttgtcc 1020
cccgtgtac gccgagacca agcacttcct ctactcctca ggcgacaagg agcagctgcg 1080
gacctccttc ctactcagct ctctgaggcc cagcctgact ggcgctcgga ggctcgtgga 1140
gacctccttc ctgggttcca ggccctggat gccagggact ccccgaggt tgccccgcct 1200
55 gccccagcgc tactggcaaa tgccggccct gtttctggag ctgcttggga accacgcgca 1260
gtgcccctac ggggtgctcc tcaagacgca ctgcccgtg cgagctgcgg tcacccagc 1320
agccggtgtc tgtgcccggg agaagcccca gggctctgtg gcggcccccg aggaggagga 1380
cacagacccc cgtcgccgtg tgcagctgct ccgccagcac agcagccctt ggcaggtgta 1440
cggttctgtg cgggcctgcc tgcgcgggct ggtgccccca ggctctgtgg gctccaggca 1500
60 caacgaacgc cgcttctca ggaacaccaa gaagttcatc tccctgggga agcatgccaa 1560
gctctcgctg caggagctga cgtggaagat gacgctgcgg gactgcgctt ggctgcgag 1620
gagcccaggg gttggctgtg ttccggccgc agagcaccgt ctgcgtgagg agatcctggc 1680

65

ES 2 345 720 T3

	caagttcctg	cactgggtga	tgagtgtgta	cgctcgtcag	ctgctcaggt	ctttcttttta	1740
	tgtcacggag	accacgtttc	aaaagaacag	gctctttttc	taccggaaga	gtgtctggag	1800
	caagttgcaa	agcattggaa	tcagacagca	cttgaagagg	gtgcagctgc	gggagctgtc	1860
5	ggaagcagag	gtcaggcagc	atcgggaagc	caggccccgc	ctgctgacgt	ccagactccg	1920
	cttcatcccc	aagcctgacg	ggctgcggcc	gattgtgaac	atggactacg	tcgtgggagc	1980
	cagaacgttc	cgcagagaaa	agagggccga	gcgtctcacc	tcgaggggtga	aggcactggt	2040
	cagcgtgctc	aactacgagc	gggcgcggcg	ccccggcctc	ctgggcgctc	ctgtgctggg	2100
	cctggacgat	atccacaggg	cctggcgcac	cttcgtgctg	cgtgtgcggg	cccaggaccc	2160
10	gccgcctgag	ctgtactttg	tcaaggtgga	tgtgacgggc	gcgtacgaca	ccatccccca	2220
	ggacaggctc	acggagggtca	tcgccagcat	catcaaacc	cagaacacgt	actgctgtcg	2280
	tcggtatgcc	gtgggtccaga	aggccgcca	tgggcacgtc	cgcaaggcct	tcaagagcca	2340
	cgtctctacc	ttgacagacc	tccagccgta	catgcgacag	ttcgtggctc	acctgcagga	2400
	gaccagcccg	ctgaggggatg	ccgtcgtcat	cgagcagagc	tcctccctga	atgaggccag	2460
15	cagtggcctc	ttcgacgtct	tcctacgctt	catgtgccac	cacgccgtgc	gcacagggg	2520
	caagtcctac	gtccagtgcc	aggggatccc	gcagggctcc	atcctctcca	cgctgctctg	2580
	cagcctgtgc	tacggcgaca	tggagaacaa	gctgtttgcg	gggattcggc	gggacgggct	2640
	gctcctgcgt	ttggtggatg	atttcttggt	ggtagacact	cacctcacc	acgcgaaaac	2700
	cttcctcagg	accctgggtcc	gaggtgtccc	tgagtatggc	tgcgtgggtga	acttgcggaa	2760
20	gacagtgggtg	aacttccctg	tagaagacga	ggccctgggt	ggcacggcctt	ttgttcagat	2820
	gccggccccc	ggcctattcc	cctgggtcgg	cctgctgctg	gatacccgga	ccctggagggt	2880
	gcagagcgac	tactccagct	atgcccgac	ctccatcaga	gccagtctca	ccttcaaccg	2940
	cggcttcaag	gctgggagga	acatgcgtcg	caaactcttt	ggggctcttgc	ggctgaagtg	3000
	tcacagcctg	tttctggatt	tgcaggtgaa	cagcctccag	acgggtgtgca	ccaacatcta	3060
25	caagatccctc	ctgctgcagg	cgtacaggtt	tcacgcatgt	gtgctgcagc	tcccatttca	3120
	tcagcaagtt	tggagaagacc	ccacattttt	cctgcgcgtc	atctctgaca	cggcctccct	3180
	ctgctactcc	atcctgaaag	ccaagaacgc	agggatgtcg	ctggggggcca	agggcgccgc	3240
	cggccctctg	ccctccgagg	ccgtgcagtg	gctgtgccac	caagcattcc	tgctcaagct	3300
	gactcgacac	cgtgtcacct	acgtgccact	cctgggggtca	ctcaggacag	cccagacgca	3360
30	gctgagtcgg	aagctccccg	ggacgacgct	gactgcctcg	gaggcccgag	ccaacccggc	3420
	actgcccctca	gacttcaaga	ccatcctgga	ctgatggcca	cccgccaca	gccaggccga	3480
	gagcagacac	cagcagccct	gtcacgcccg	gctctacgtc	ccagggaggg	aggggcggcc	3540
	cacacccagg	cccgcaccgc	tgggagtcgt	aggcctgagt	gagtgttttg	ccgaggcctg	3600
	catgtccggc	tgaaggctga	gtgtccggct	gaggcctgag	cgagtgtcca	gccaagggct	3660
35	gagtgtccag	cacacctgcc	gtcttcaact	ccccacaggc	tggcgctcgg	ctccaccca	3720
	gggccagctt	ttcctcacca	ggagcccggc	ttccactccc	cacataggaa	tagtccatcc	3780
	ccagattcgc	cattgttcac	ccctcgccct	gcctctcttt	gccttccacc	cccaccatcc	3840
	aggtggagac	cctgagaagg	accctgggag	ctctgggaat	ttggagtgc	caaaggtgtg	3900
40	ccctgtacac	agggcaggag	cctgcacctg	gatgggggtc	cctgtgggtc	aaattggggg	3960
	gaggtgctgt	gggagtaaaa	tactgaatat	atgagttttt	cagttttgaa	aaaaa	4015
<210> 5							
45	<211> 451						
	<212> ADN						
	<213> <i>Homo sapiens</i>						
50	<220>						
	<223> componente ARN de la telomerasa humana (TERC)						
<400> 5							
55							
	gggttgcgga	gggtgggcct	gggaggggtg	gtggccattt	tttgtctaac	cctaactgag	60
	aagggcgtag	gcgcctgtct	tttgtctccc	gcgcgtgttt	tttctcgctg	actttcagcg	120
	ggcggaagaa	cctcggcctg	ccgccttcca	ccgttcattc	tagagcaaac	aaaaaatgtc	180
60	agctgctggc	ccgttcgccc	ctcccgggga	cctgcggcgg	gtcgcctgcc	cagcccccca	240
	accccgccctg	gaggccgcgg	tcggcccggg	gcttctccgg	aggcaccac	tgccaccgcg	300
	aagagttggg	ctctgtcagc	cgcgggtctc	tcgggggcga	gggcgaggtt	caggcctttc	360
65							
	aggccgcagg	aagaggaacg	gagcgagtcc	ccgcgcgcgg	cgcgattccc	tgagctgtgg	420
	qacgtgcacc	caggactcgg	ctcacacatg	c			451

ES 2 345 720 T3

	<210> 6	
	<211> 24	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador “sentido” directo de SENP1	
10	<400> 6	
	caagaagtgc agcttataat ccaa	24
15	<210> 7	
	<211> 21	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador “antisentido” inverso de SENP1	
25	<400> 7	
	gtctttcggg ttctgagta a	21
30	<210> 8	
	<211> 26	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: sonda TaqMan de SENP1	
40	<400> 8	
	ctcagacagt ttcttggt caggeg	26
45	<210> 9	
	<211> 20	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador directo PP1CA	
55	<400> 9	
	gagcacacca ggtgtagaa	20
60	<210> 10	
	<211> 19	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador inverso PPP1CA	

ES 2 345 720 T3

<400> 10

gggcttgagg atctggaaa

19

5

<210> 11

<211> 30

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: sonda PPP1CA

15

<400> 11

gagtttgaca atgctggcgc catgatgagt

30

20

<210> 12

<211> 5

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: sustrato/inhibidor específico de proteasa de SENP1, antagonista de SENP1

30

<400> 12

Glu Gln Thr Gly Gly
1 5

35

<210> 13

40

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: secuencia de señal de localización nuclear (NLS1)

<400> 13

50

Pro Lys Lys Thr Gln Arg Arg
1 5

55

<210> 14

<211> 22

<212> PRT

60 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: secuencia C-terminal Sm31 de la proteína modificadora de pequeño tamaño de tipo ubiquitina (SUMO)

65

ES 2 345 720 T3

<400> 14

Thr Ile Asp Val Phe Gln Gln Gln Thr Gly Gly Val Pro Glu Ser Ser
5 1 5 10 15

Leu Ala Gly His Ser Phe
20

10 $\langle 210 \rangle$ 15

<211> 13

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de secuencia artificial: secuencia C-terminal Sm32 de proteína modificadora de pequeño tamaño (SUMO)

20
 $\langle 400 \rangle$ 15

Thr Ile Asp Val Phe Gln Gln Gln Thr Gly Gly Val Tyr
1 5 10

<210> 16

... $\langle 211 \rangle$ 15

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 $\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de secuencia artificial: secuencia C-terminal Sm33 de proteína modificadora de pequeño tamaño (SUMO)

40 <400> 16

Val Ile Glu Val Tyr Gln Glu Gln Thr Gly Gly His Ser Thr Val
1 5 10 15

45

<210> 17

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

55 <223> Descripción de secuencia artificial: secuencia C-terminal Smt3 de proteína modificador de pequeño tamaño (SUMO)

<400> 17

60 Ile Ile Glu Ala His Arg Glu Gln Ile Gly Gly Ala Thr Tyr
1 5 10

65 $\langle 210 \rangle$ 18

<211> 14

ES 2 345 720 T3

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador directo de TERT

<400> 18

10

tgggcacgtc cgca

14

<210> 19

15 <211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador inverso de TERT

<400> 19

25

ggcgtggtgg cacatgaa

18

<210> 20

30 <211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: sonda TaqMan de TERT

<400> 20

40

tcacgagca gagctcctcc ctgaatgagg

30

45

50

55

60

65